

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07C 211/14, 237/10, A61K 47/18		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/08997
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	25. Februar 1999 (25.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05156		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. August 1998 (13.08.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 35 125.5 13. August 1997 (13.08.97) DE 198 34 683.2 31. Juli 1998 (31.07.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIONTEX LABORATORIES GMBH [DE/DE]; Frankfurter Ring 193 a, D-80807 München (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLÖSEL, Roland [DE/DE]; Dülferstrasse 26 a, D-80933 München (DE). KÖNIG, Stephan [DE/DE]; Waldweg 16, D-85567 Grafing bei München (DE).			
(74) Anwälte: FORSTMAYER, Dietmar usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).			
(54) Title: NOVEL LIPOPOLYAMINES, AND THE PREPARATION AND USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: NEUE LIPOPOLYAMINE, DEREN DARSTELLUNG UND ANWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to novel lipopolyamines (including their salts), characterised by a symmetrical, highly flexible lipophilic component with a buffering capacity at physiological pH, and to their use for funnelling biologically active materials such as DNA, RNA, ribozymes, antisense DNA, peptides and proteins into eukaryotic cells in vivo or in vitro.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft neue Lipopolyamine (einschließlich deren Salze), gekennzeichnet durch einen symmetrischen, hochflexiblen lipophilen Anteil mit Pufferungsvermögen bei physiologischem pH, sowie deren Anwendung zur Einschleusung von biologisch aktiven Materialien, wie zum Beispiel DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, Peptiden und Proteinen in eukaryotische Zellen in vivo oder in vitro.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Neue Lipopolyamine, deren Darstellung und Anwendung

Positiv geladene Lipide (J. P. Behr, Bioconjugate Chem. 5, 382-389, 1994) werden in Form von Liposomen, Micellen oder als solche zur Einschleusung von biologisch aktiven Substanzen wie Peptiden, Peptoiden, Proteinen, PNA, antiviralen Wirkstoffen insbesondere aber DNA, RNA, Antisense-DNA/RNA oder Ribozymen in eukariotische Zellen (zum Beispiel Säuger-, Pflanzen-, oder Insektenzellen) eingesetzt. Lipopolyamine sind eine spezielle Klasse von kationischen Lipiden, die vergleichsweise hervorragende Transfektionseigenschaften zeigen. Unter Transfektion versteht man die Einschleusung von Erbmaterial in eukariotische Zellen.

Die Notwendigkeit DNA (zum Beispiel Plasmide, Cosmide, einzelsträngig oder doppelsträngig), RNA oder verwandte Stoffklassen, wie Antisense-DNA/RNA oder Ribozyme in eukariotische Zellen einzuführen, um beispielsweise erfolgreich Gentherapie betreiben zu können, führte zur Entwicklung einer Vielzahl von Transfektionsmethoden. Zur Einführung von Nukleinsäuren in eukariotische und insbesondere in Säugerzellen ist eine Vielzahl von Verfahren, wie zum Beispiel die CaPO_4 -Präzipitationsmethode, die DEAE-Dextran-Methode, synthetische Polyamine (Polyethylenimin, Polylysin, PAMAM-Dendrimere), Methoden, welche die rezeptorvermittelte Endocytose nutzen, Elektroporation, Mikrobombardement, Mikroinjektion und Verfahren, die virale Capside als DNA-Carrier benutzen, bekannt. Eine weitere Methode wird Lipofektion (P. L. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 7413 1987) genannt. Diese nutzt die Tatsache, daß synthetische kationische Lipide in Form von Liposomen, Micellen oder als solche mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden. Stellt man die Mengenverhältnisse von DNA und kationischem Lipid so ein, daß die resultierenden Komplexe eine positive Nettoladung tragen, so besitzen sie eine hohe Affinität zu der negativ geladenen Membranoberfläche eukariotischer Zellen. Treffen solche DNA/Lipid-Komplexe auf Zellen, so kommt es zu einer Einschleusung des genetischen Materials in die Zelle. Der genaue Mechanismus, wie die DNA in die Zellen gelangt, ist noch weitgehend unbekannt, man vermutet jedoch, daß es entweder zu einer Fusionierung der kationischen Lipide mit der anionischen Zellmembran bei gleichzeitiger Ausschüttung der DNA in das Zellinnere kommt, oder daß die DNA/Lipid-Komplexe als Ganzes über einen natürlichen Transportmechanismus der Zellen, die sogenannte Endozytose, in die Zelle gelangen und danach die DNA freigesetzt wird.

Liposomen sind in der Regel kugelförmige Anordnungen von Lipiden in wässrigen Lösungen mit „Bilayer-Struktur“ und werden typischerweise in drei Klassifikationen eingeteilt (siehe N.Y. Academy Sciences Meeting: „Liposomes and their use in Biology and Medicine“ von Dezem-

BESTÄTIGUNGSKOPIE

ber 1977): Multilamellare Vesikel (MLV, bis zu 10000 nm), kleine unilamellare Vesikel (SUV, 20-50 nm) und große unilamellare Vesikel (LUV, 600-30000 nm). Eine Reihe von Herstellungsmethoden für Liposomen ist bekannt und in „Liposome Technology“ (Gregoriadis, CFC Press, N.Y. 1984), in „Liposomes“ (Ostro, Marcel Dekker, N.Y. 1987) oder in Übersichtsartikeln von Lichtenberg et al. (Methods Biochem. Anal. 33, 337-462, 1988), Pagano und Weinstein (Ann. Rev. Biophysic. Bioeng. 7, 435-68, 1978), oder Szoka und Papahadjopoulos (Ann. Rev. Biophysic. Bioeng. 9, 467-508, 1980) beschrieben. Bekannte Methoden sind beispielsweise die „reverse-phase evaporation“-Methode und die Extrusionsmethode, bei der eine Lipidlösung durch eine mikroporöse Membran gepresst wird.

Liposomen werden typischerweise auch auf folgendem Weg hergestellt: Die Lipide werden in einem organischen Lösungsmittel aufgenommen. Durch Verdampfen des Lösungsmittels unter einem Strom von Stickstoff wird an der Glasgefäßwand ein dünner Lipidfilm erzeugt. Zugabe von Wasser oder wässriger Pufferlösung hydratisiert diesen Film. Die erhaltene Lösung wird zuletzt mit Ultraschall behandelt.

Kationische Lipide gewinnen zunehmende Bedeutung in der Gentherapie. Dabei werden in vivo mit verschiedenen Verfahren Körperzellen transfektiert, indem Komplexe aus Carrier und DNA intradermal, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, subkutan, intranasal, in Liquorräume oder direkt in Tumore verabreicht werden oder Körperzellen entnommen, transfektiert und wieder reimplantiert werden. Eine in diesem Zusammenhang favorisierte Methode war bis vor einiger Zeit die Einbringung des genetischen Materials durch virale Carrier. Diese Methode besitzt jedoch die Gefahr der Rückmutation zu einem pathogenen Virus. Desweiteren wird die eingeschleuste DNA stabil in das Erbgut eingebaut, so daß eine Steuerung der Therapie oder eine Rückführung der Zellen in ihren ursprünglichen Zustand nicht mehr möglich ist. Zudem besitzen virale Carrier Restriktionen bezüglich der Größe der einzuschleusenden DNA. Modifizierte DNA oder RNA wird durch Viren nicht übertragen. Außerdem können nur sich teilende Zellen auf diesem Wege transfektiert werden.

Weitere Gefahren, die bei der Anwendung von viralen Carriersystemen zu berücksichtigen sind, sind die mögliche Aktivierung von Oncogenen und eine Immunreaktion des behandelten Organismus.

Die Transfektion mit kationischen Lipiden ist diesen Restriktionen hingegen nicht unterworfen. Die Transfektion verläuft in der Regel transient, das heißt, die transfektierte DNA oder RNA wird nur für eine bestimmte Zeit exprimiert, da sie nicht in das Erbgut eingebaut wird und durch Nukleasen mit der Zeit abgebaut wird. Auf diese Weise kann Gentherapie dosiert und reversibel gemacht werden. Restriktionen bezüglich der Größe der DNA bestehen nicht und

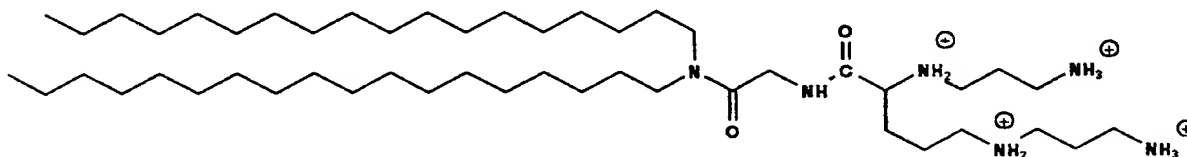
auch modifizierte DNA oder RNA (z.B. Antisense-DNA/RNA oder durch Einbau modifizierter Nukleotide stabilisierte Ribozyme) kann mittels kationischer Lipide in Zellen eingeschleust werden. Auch sich nicht teilende Zellen, wie zum Beispiel Nervenzellen, können durch kationische Lipide transfektiert werden. Desweiteren wurde bisher kein immunogenes Verhalten von kationischen Lipiden bei in vivo Versuchen gefunden.

Während die in vivo-Anwendung von Mikroinjektion und Elektroporation aus Verfahrensgründen nicht möglich erscheint, besitzen die CaPO_4 - und DEAE-Dextran-Methoden verglichen mit der Lipofektion eine schlechtere Transfektionseffizienz.

Unter den kationischen Lipiden gibt es eine Klasse, die die bekannt hohe Affinität zwischen Polyaminen (z.B. Spermin, Spermidin) und DNA zur Transfektion ausnützen, sogenannte Lipopolyamine. Die Polyamine sind dabei linear oder verzweigt aufgebaut und enthalten Ethylen-, Propylen-, oder Butylengruppen zwischen den Aminofunktionen. Die Polyamine sind auf unterschiedlichste Weise mit einem lipophilen Rest verbunden.

Beispielsweise wird das bei physiologischem pH-Wert positiv geladene Spermin mit einem hydrophilen Rest, in manchen Fällen über einen Spacer, verknüpft. Spermin bildet stabile Komplexe mit DNA und ähnlichen Verbindungen, indem es über Wasserstoffbrückenbindung in der Furche der DNA gebunden wird.

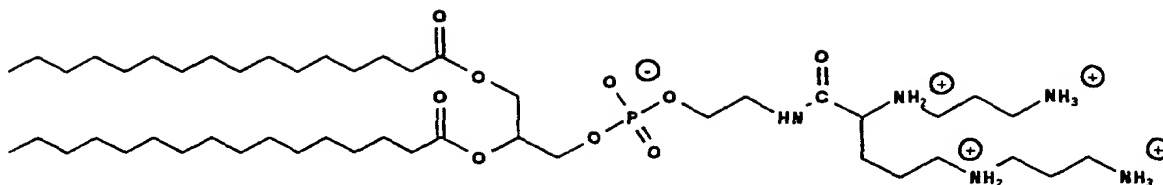
Die ersten solchen Liposperminderivate wurden von Behr, J. P. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; 1989; EP 0394111) synthetisiert. Dabei verknüpften sie Carboxyspermin über einen Spacer mit zwei unterschiedlichen hydrophilen Resten. Die Struktur des dabei erhaltenen 5-Carboxyspermylglycindiocetamid (DOGS) ist:



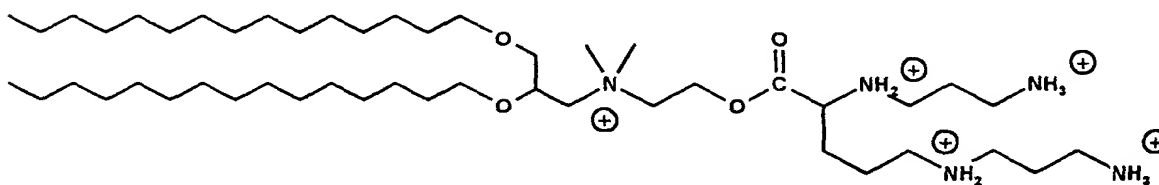
DOGS ist als Transfectam™ (Promega) kommerziell erhältlich.

Die zweite von Behr et al. entwickelte Verbindung ist Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-5-carboxyspermylamid (DPPES):

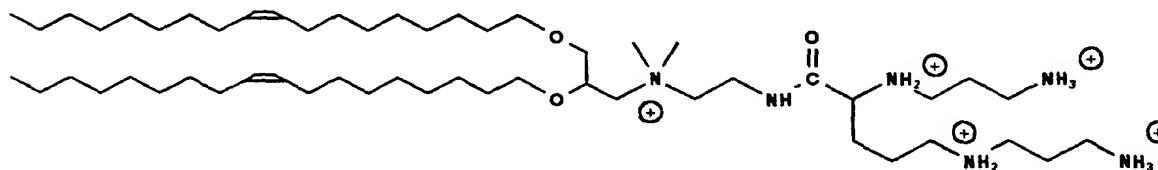
4



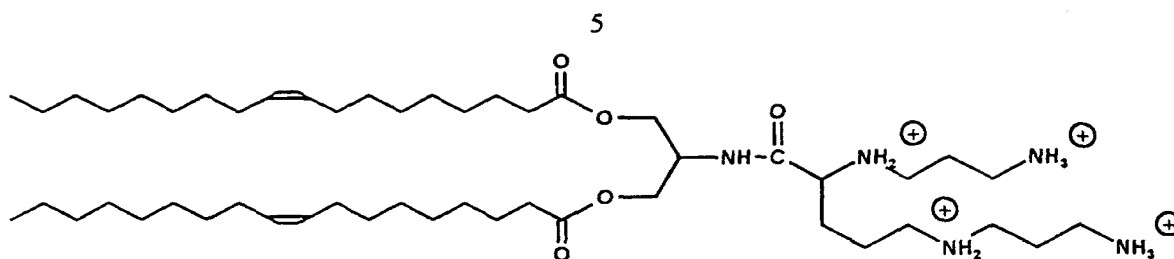
Ein weiteres Liposperminderivat wird von P. L. Felgner et al. in WO 9116024 unter der Bezeichnung L-Spermin-5-carboxyl-3-(DL-1,2-dioleoyldimethylaminopropyl- β -hydroxyethylamin) beansprucht. In der Patentschrift beschrieben ist jedoch L-Spermin-5-carboxyl-3-(DL-1,2-dipalmitoyl-dimethylaminopropyl- β -hydroxyethylamin):



Gebeyehu, G. et al. beschreiben in WO 9405624 die Verbindung N-[N-(5-Carboxyspermyl)aminoethyl] N, N-dimethyl-2,3-bis (9-octadecenyloxy) 1-propanammonium tetra (trifluoracetat), welches kommerziell als Lipofectamin™ (Gibco-BRL : Life Technologies Inc.) erhältlich ist.



Von Der Eltz et al. beschreiben in WO 9700241 die Verbindung 2-(6-Carboxy-spermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, die unter dem Namen DOSPER auf den Markt gebracht wurde (Boehringer Mannheim GmbH).



Die bisher genannten Verbindungen wurden alle über eine Amid- oder Esterverknüpfung eines linearen Polyamins, welches eine Carboxyfunktion als Seitenkette trägt, i.e. von Carboxyspermin zu einem lipophilen Rest hergestellt. Spätere Veröffentlichungen zeigen schließlich auch andere Verknüpfungsweisen von linearen Polyaminen zu den lipophilen Resten, z.B. durch eine Amid- oder Carbamatverknüpfung zu einer endständigen Aminofunktion (lineare Struktur) oder inneren Aminofunktion („T-shape-structure“) des linearen Polyamins. Beispiele finden sich in den Veröffentlichungen DE 1963189, WO 9640726, WO 9640725, WO 9618372, WO 9746223, WO 9802190 und WO 9802191.

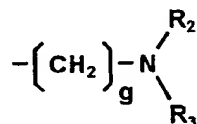
Auch verzweigte Polyamine wurden beschrieben (G. Byk et al, J. Med. Chem., 41, 224-235, 1998).

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Transfektion mittels kationischer Lipide, verbleibt ein Bedarf an einer größeren Auswahl solcher Lipide. Der Grund dafür liegt darin, daß bis heute kein kationisches Lipid gefunden wurde, daß mit allen Zelltypen befriedigende Ergebnisse liefert. Da verschiedene Zelltypen „sich in ihrer Membranzusammensetzung unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, daß verschiedene Kompositionen von Lipiden und verschiedenartige Lipidtypen für eine effektive Transfektion unterschiedlicher Zellen benötigt werden.

Da über den eigentlichen Transfektionsschritt bis heute noch wenig bekannt ist, ist die Entwicklung von neuen kationischen Lipiden weitgehend empirisch. Wichtige zu beachtende Gesichtspunkte für das Design solcher Lipide sollten daher ihre physikalischen Eigenschaften bezüglich der Ausbildung von Liposomen oder Micellen, die Eigenschaften der gebildeten Liposomen oder Micellen, die Toxizität gegenüber den zu transfektierenden Zielzellen, desweiteren die Stabilität der Lipide, deren Metabolisierbarkeit und die Möglichkeit einer in vivo-Anwendung sein.

Die erfindungsgemäß zu lösende Aufgabe bestand daher darin, neue kationische Lipide mit hoher Wirksamkeit und möglichst breitem Wirkungsspektrum in Kombination mit guter Stabilität und geringer Toxizität zu finden. Bei der vorliegenden Erfindung wurde nun überr-

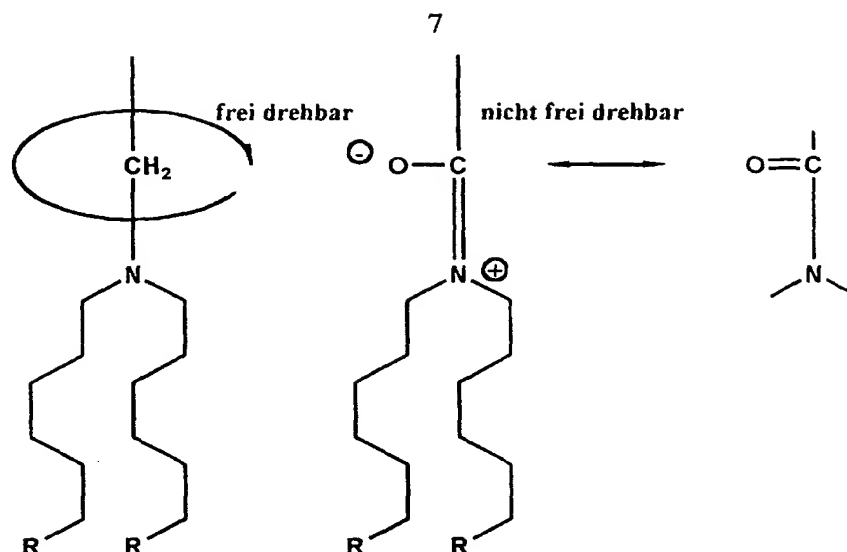
schenderweise gefunden, daß die Kombination von Polyaminen als Kopfgruppe mit einem speziellen lipophilen Rest zu besonders guten Eigenschaften in Hinblick auf Effizienz und Stabilität führt:



Die Reste R sind dabei gesättigte oder ungesättigte lineare oder verzweigte Alkylketten, vorzugsweise mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen.

Als Erklärung mögen folgende Hypothesen dienen. Von besonderer Bedeutung für eine erfolgreiche Transfektion hat sich die Bildung eines sogenannten DNA-Lipid-Komplexes erwiesen. Beim Zusammentreffen von DNA und kationischen Lipiden, die als Liposomen- oder Micellenformulierungen eingesetzt werden, kommt es zu einer spontanen Kondensation der DNA unter Zusammenbruch der liposomalen oder micellenartigen Organisationsstruktur der kationischen Lipide. Es bildet sich ein DNA-Lipid-Komplex aus, in dem die DNA in einem multilamellaren Komplex mit „Bilayerstruktur“ aus den besagten Lipiden eingebettet ist (J. O. Rädler et al. Science, 275, 810, 1997). Ist z.B. die Spermingruppe als DNA-affine Kopfgruppe erst einmal an die DNA gebunden, kommt somit der Flexibilität und Symmetrie des restlichen Molekülteils (lipophiler Rest) besondere Bedeutung zu, da die Alkylgruppen in der Lage sein müssen, sich möglichst parallel auszurichten, um über Van-der-Waals-Kräfte stabile „Bilayer-Strukturen“ ausbilden zu können.

Die bisher vorgeschlagenen Verbindungen sind in der Regel wenig symmetrisch aufgebaut, was eine parallele Ausrichtung der Alkylreste erschwert, und beinhalten allesamt Ester, Ether oder Amidverknüpfungen zwischen den Alkylresten und einem Grundgerüst bzw. einem Spacer. Diese Verbindungen sind daher in ihrer Flexibilität aufgrund der festgelegten Bindungswinkel und im Falle von Amidverknüpfungen (z.B. bei Verbindungen aus G. Byk et al, J. Med. Chem., 41, 224-235, 1998, EP 0394111, WO 9618372, WO 9746223, WO 9802190 und WO 9802191) aufgrund vorhandener Resonanzstrukturen stark eingeschränkt.



In der Resonanzstruktur für Amide trägt das O-Atom eine negative und das Amid-N-Atom eine positive Ladung. Es resultiert eine planare Anordnung der an der Amidbindung beteiligten Atome. Eine freie Rotation der Amidbindung zwischen Carbonyl-Kohlenstoff und dem Stickstoffatom ist nicht möglich. Diese Eigenschaft wirkt sich beispielsweise in ganz besonderer Weise auf die Struktur von Proteinen aus. (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur), deren Peptidbindungen nichts anderes als Amidverknüpfungen sind. Erst die starren, nichtflexiblen Amidverknüpfungen geben dem Protein seine biologisch notwendige Struktur.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen (siehe auch unten) verknüpfen die Alkylreste R_2 und R_3 über ein tertiäres Stickstoffatom (Amin). Damit ist eine hohe Symmetrie und durch die Möglichkeit des „Durchschwingens“ des freien Elektronenpaares (Pseudorotation) am Stickstoffatom maximale Flexibilität gewährleistet. Somit besteht bei diesen Verbindungen die optimale Voraussetzung zur parallelen Ausrichtung der Alkylreste (trotz an der DNA fest verankerter Kopfgruppen) und somit zur Bildung stabiler DNA-Lipid-Komplexe. Die Stabilität wird insbesondere auch durch eine große Überlappung der van der Waals-Regionen der Alkylgruppen bewirkt.

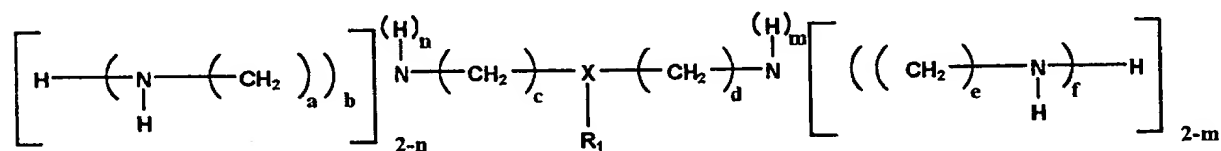
Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die besonders guten Eigenschaften der beanspruchten Verbindungen besteht darin, daß diese Verbindungen aufgrund des nicht an der DNA-Komplexbildung beteiligten basischen Stickstoffatoms, welches die Alkylreste trägt, Pufferungsvermögen im physiologischen pH-Bereich besitzen. Diese Eigenschaft fördert auf dem Weg der Endozytose die osmotischen Zerstörung der Endosomen, so daß die DNA um so besser in das Zytosol freigesetzt wird (J. P. Behr, Gene Therapy, 3,1010-1017, 1996).

8

Es hat sich insbesondere gezeigt, daß erfindungsgemäße Verbindungen, bei denen die Polyamine der Kopfgruppe, die an den lipophilen Rest R_1 gebunden ist, mindestens drei Stickstoffatome aufweisen, besonders gute Eigenschaften aufweisen; derartige Verbindungen werden daher besonders bevorzugt.

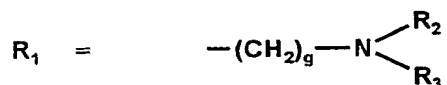
Die vorliegende Erfindung betrifft somit neue Lipopolyamine der allgemeinen Formel I, die in der Lage sind, biologisch aktive Moleküle in eukariotische Zellen zu transportieren:

Formel I:



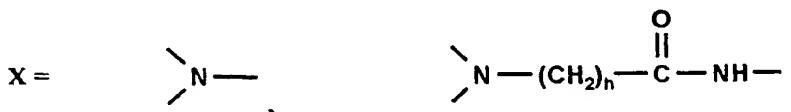
die bei Vorhandensein eines Asymmetriezentrums in der D-, L- oder DL-Form vorliegen, einschließlich ihrer Salze, wobei

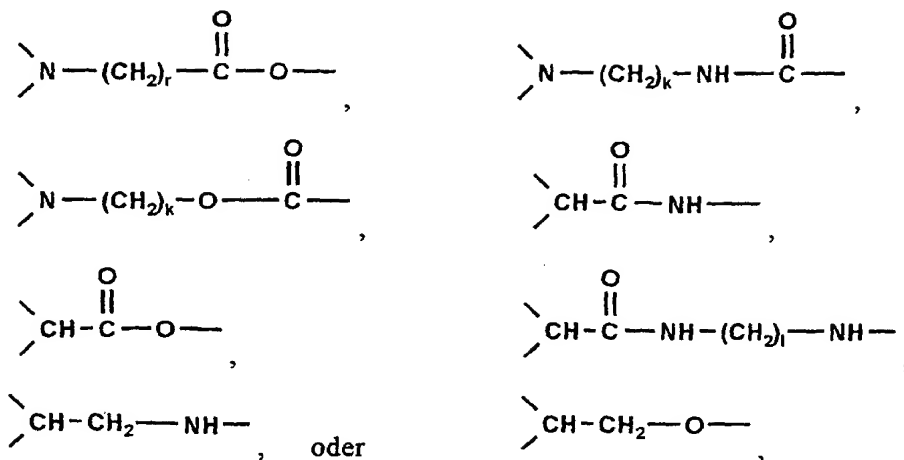
R_1 ein lipophiler Rest folgender allgemeinen Formel ist:



in welcher R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl, Octadecenyl oder andere Alkylreste, die in allen möglichen Kombinationen gesättigt, ungesättigt, verzweigt, unverzweigt, fluoriert oder nicht fluoriert sein können, und aus 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 Kohlenstoffatomen aufgebaut sind,

und X eine der folgenden Gruppierungen ist:





wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

10

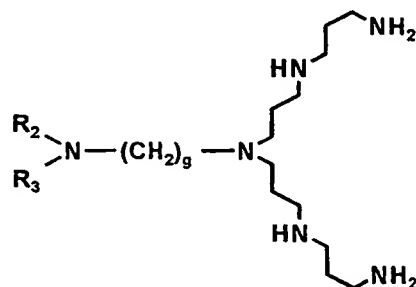
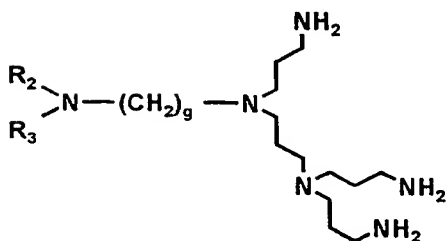
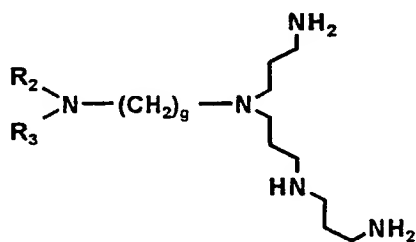
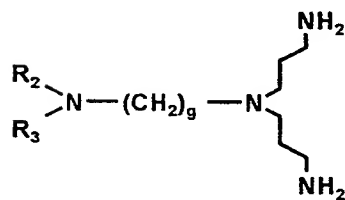
= 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, h = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, r = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, k = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 und l = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sein können,

oder

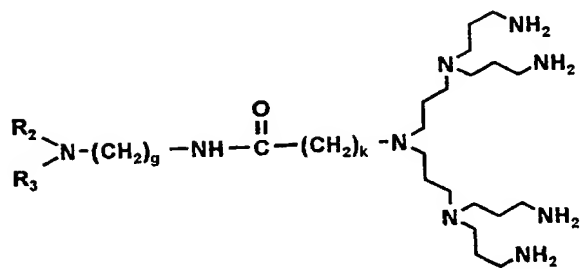
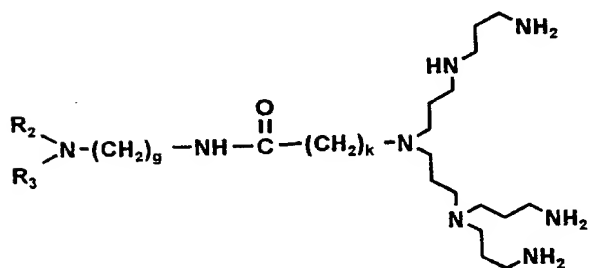
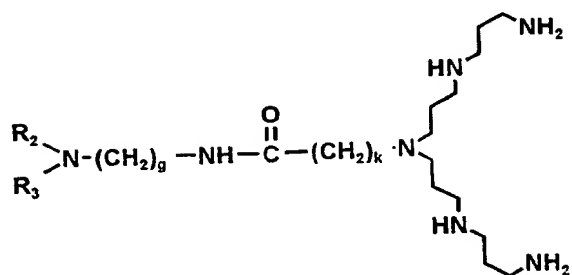
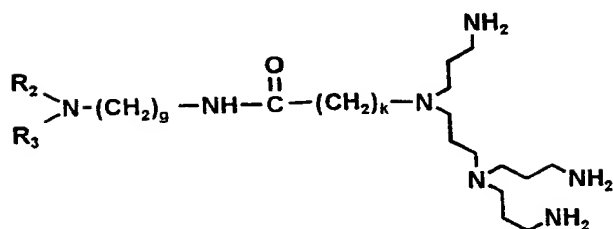
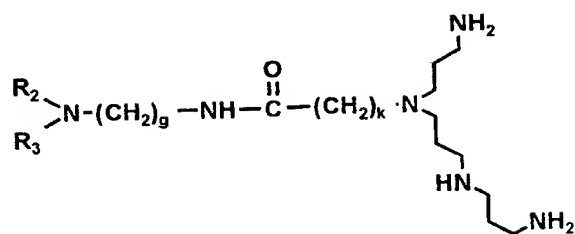
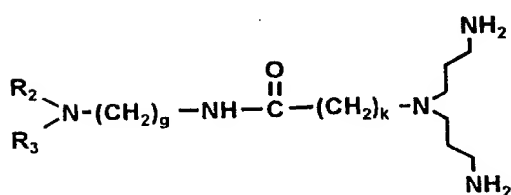
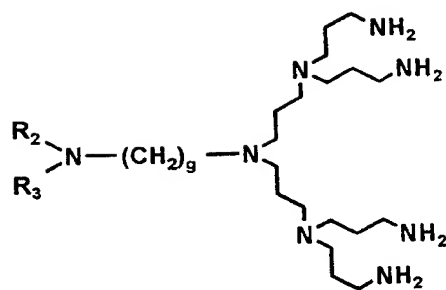
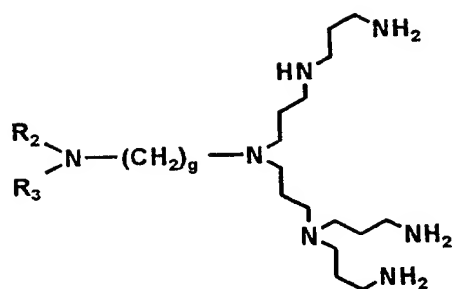
wobei m = 2 und n = 2 sind und für diesen Fall g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8, a = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, b = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, c = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, d = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, e = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, f = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, h = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, r = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, k = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 und l = 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sein können, wobei vorzugsweise maximal 50%, besonders bevorzugt 30%, der H-Atome durch F-Atome ersetzt sind.

Vorzugsweise ist $g > 1$. Bei bevorzugten Verbindungen ist $c=3$ und/oder $d=3$. Bei besonders bevorzugten Verbindungen ist $a=0$ oder 3 und/oder $e=0$ oder 3 und/oder $b=0$ oder 1 und/oder $f=0$ oder 1.

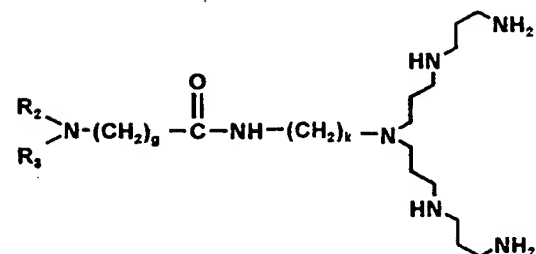
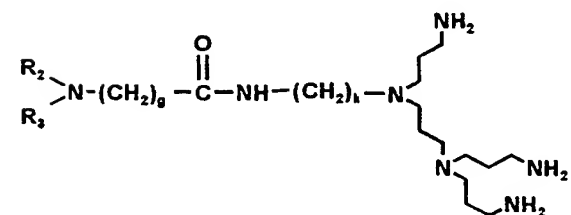
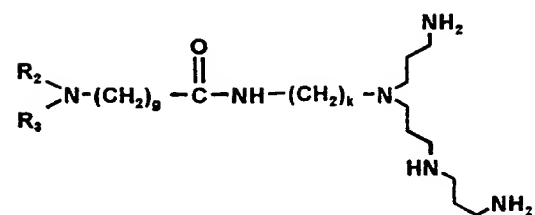
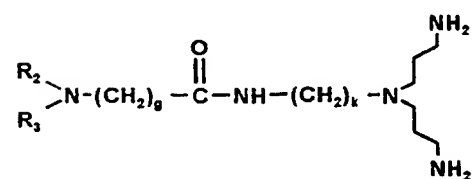
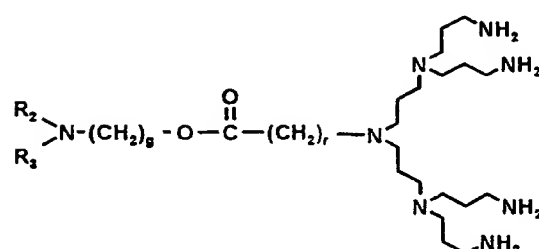
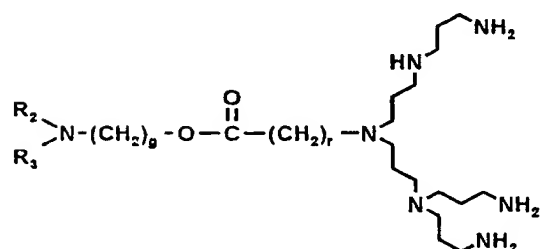
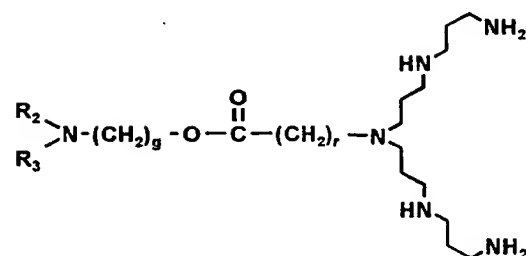
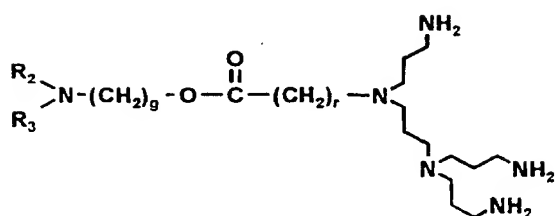
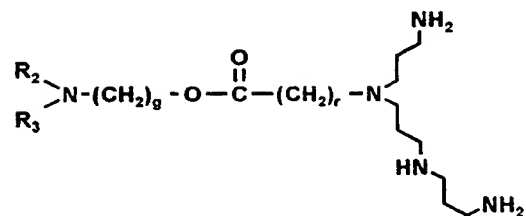
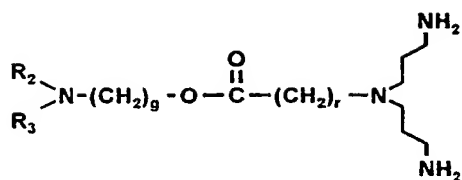
Von besonderem Interesse sind dabei Verbindungen und ihre Salze mit folgenden Strukturen:

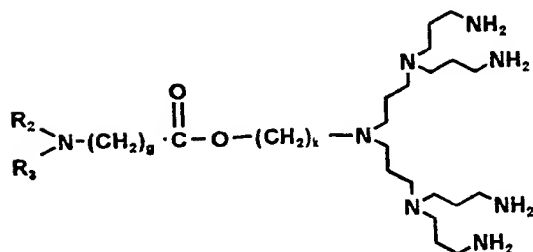
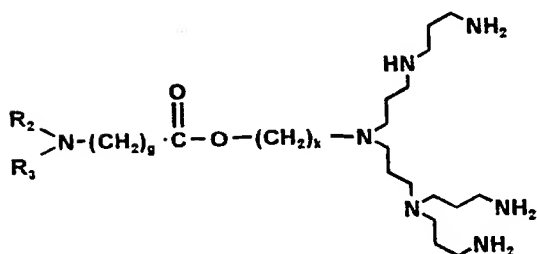
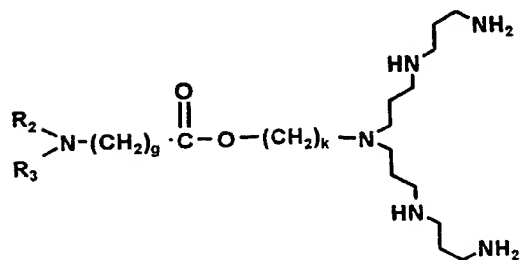
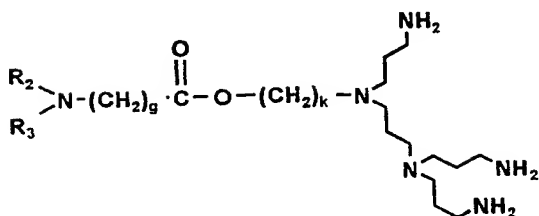
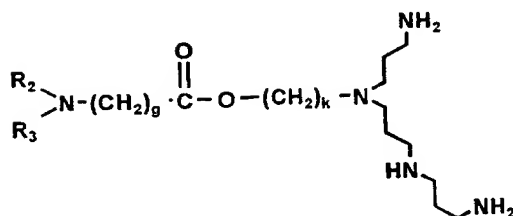
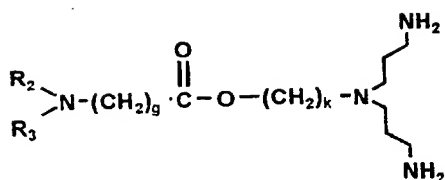
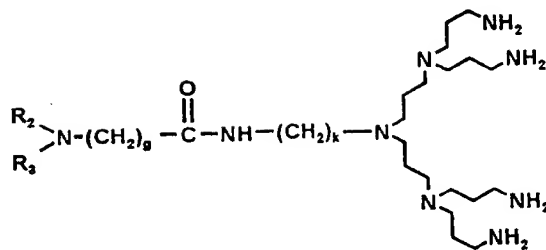
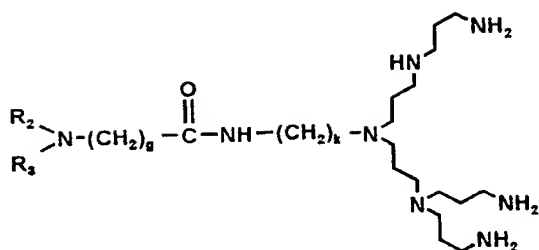


11

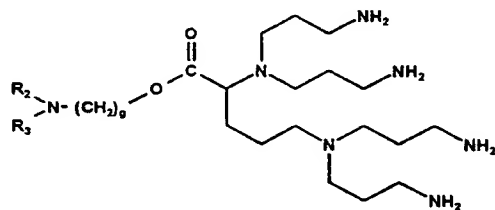
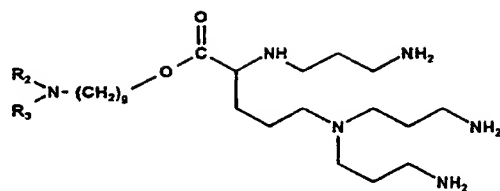
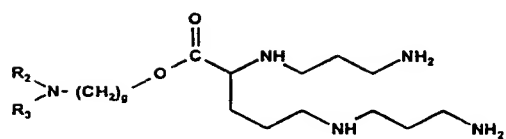
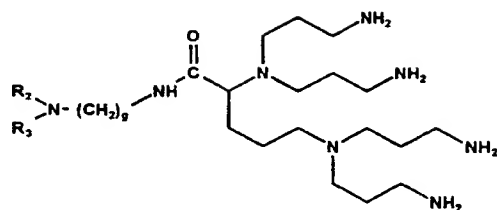
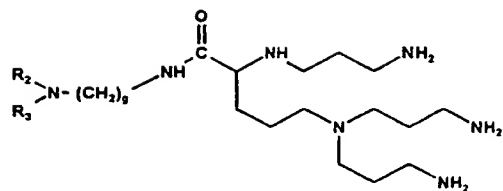
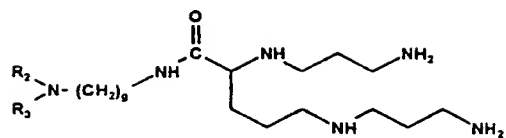


12

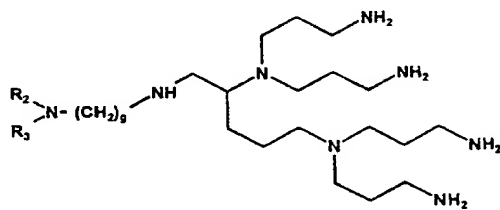
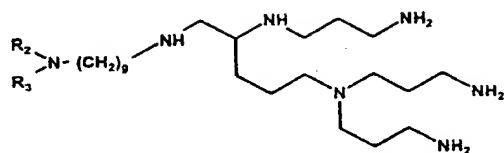
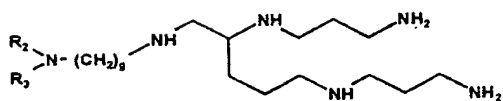
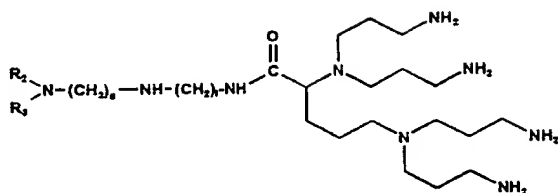
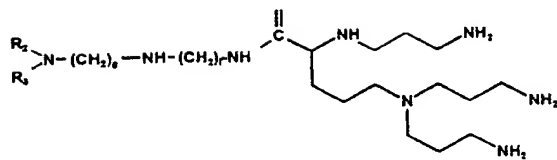
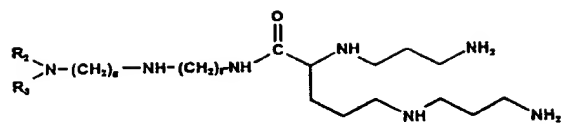




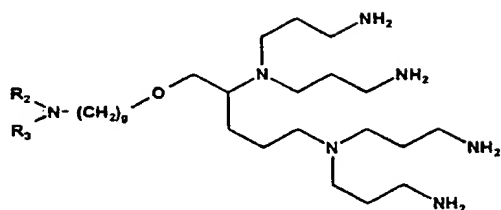
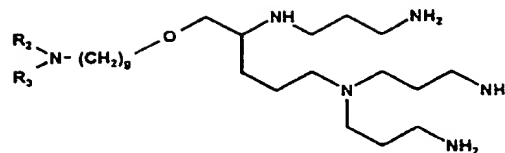
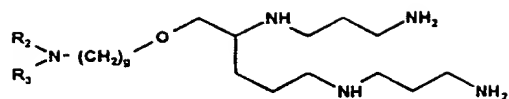
14



15

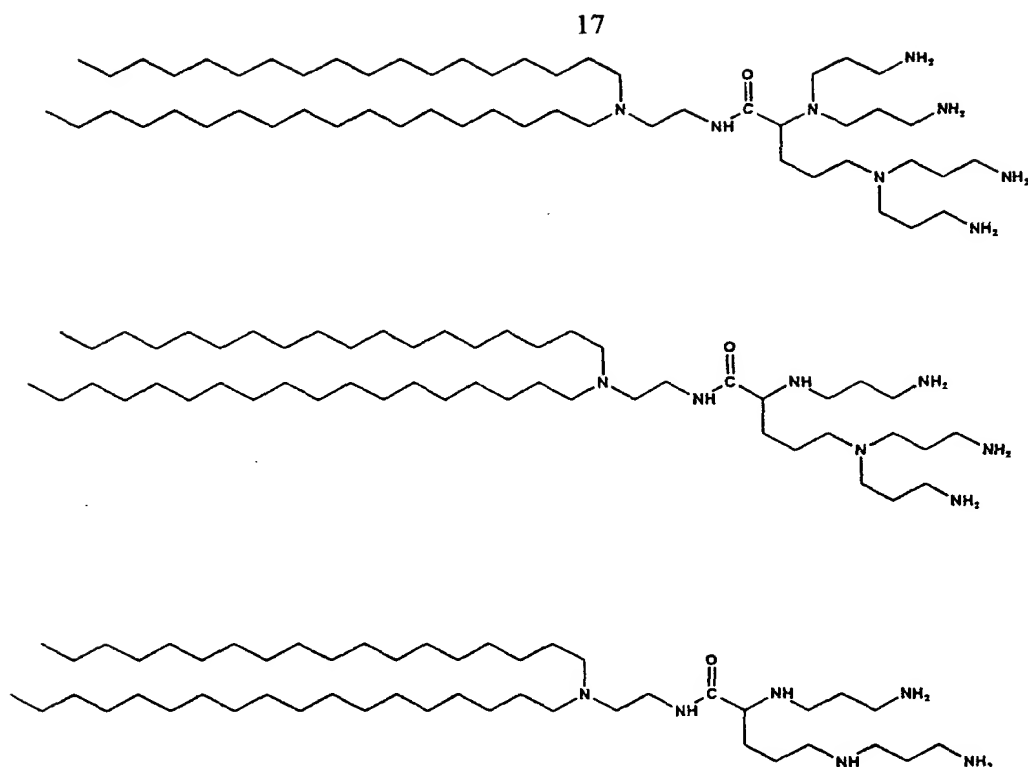


16



wobei $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können, R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

Von ganz besonderem Interesse ist dabei folgende Verbindung und ihre Salze:



Von weiterem besonderen Interesse sind Zusammensetzungen oder Formulierungen (die Liposomen oder Micellen enthalten), die mindestens eine der erfindungsgemäßen Verbindungen mit oder ohne Colipide, wie z.B. Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Dioleoylphosphatidylcholin, Cholesterol oder Cholesterylamin enthalten. Die Zusammensetzungen oder Formulierungen (die Liposomen oder Micellen enthalten) können übliche Zusatzstoffe, Träger, Adjuvantien etc. enthalten.

Von weiterem besonderen Interesse sind Verfahren zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen, wobei die erfindungsgemäßen Verbindungen, Zusammensetzungen oder Formulierungen mit den einzubringenden (biologisch aktiven) Verbindungen komplexiert und die entstandenen Komplexe mit eukariotischen Zellen in vivo oder in vitro in Kontakt gebracht werden.

Von weiterem besonderen Interesse ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen, Zusammensetzungen oder Formulierungen (zur Herstellung eines Medikaments oder eines Reagenzes) zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen, wobei die erfindungsgemäßen Verbindungen, Zusammensetzungen oder Formulierungen mit den einzubringenden (biologisch aktiven) Verbindungen komplexiert und die entstandenen Komplexe mit eukariotischen Zellen in vivo oder in vitro in Kontakt gebracht werden.

zymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen in vivo oder in vitro.

Von weiterem besonderen Interesse ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen, Zusammensetzungen oder Formulierungen (zur Herstellung eines Medikaments oder eines Reagenzes) zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen in vivo oder in vitro in Kombination mit sogenannten „Enhancern“, die die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen verstärken.

Die erfindungsgemäßen Lipide enthalten also Polyamine als DNA-affine Kopfgruppen, die gegebenenfalls über einen Spacer an einen speziellen lipophilen Rest gebunden sind.

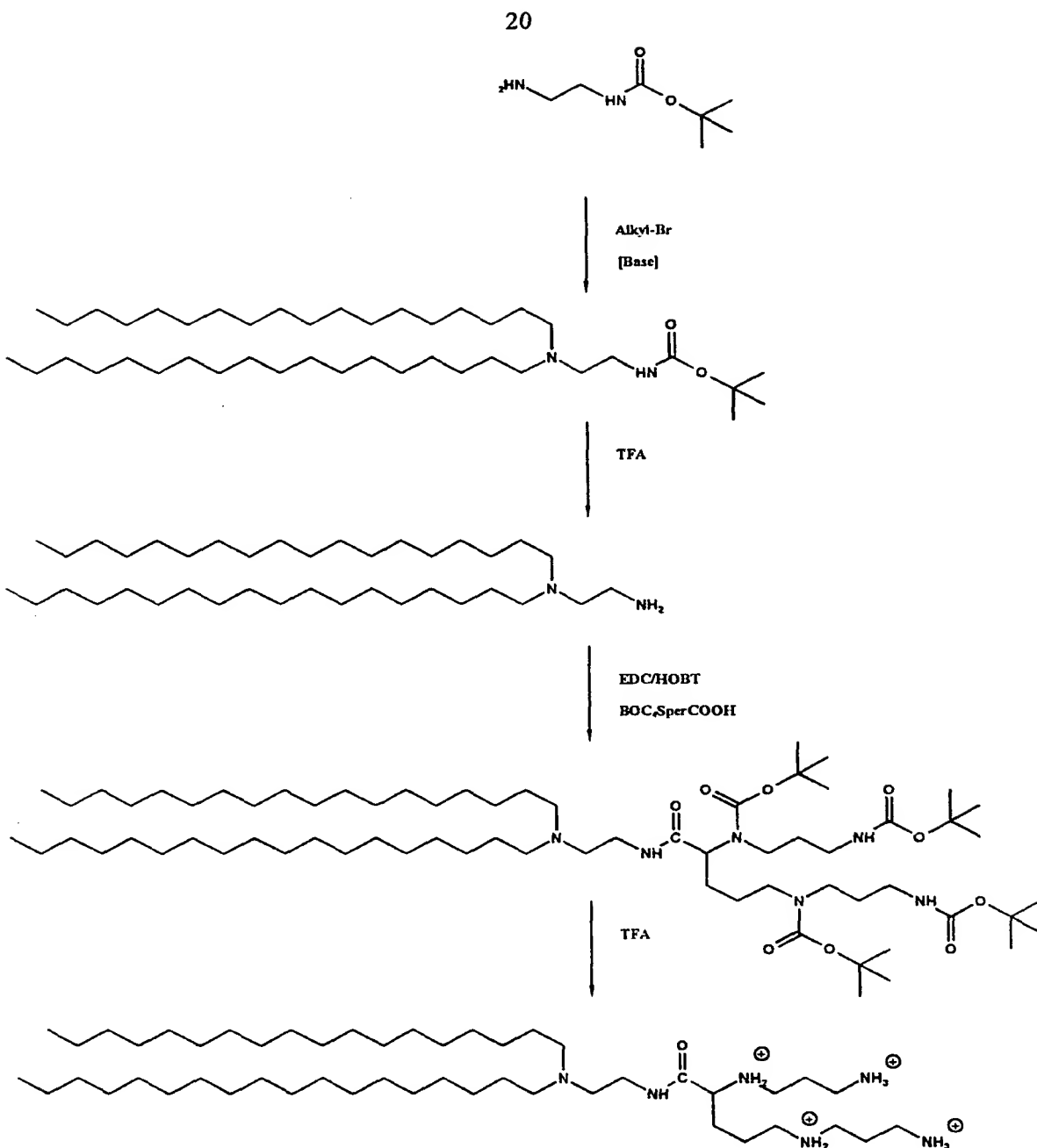
Ein besonderer Wert der erfindungsgemäßen Lipide liegt in ihrer Stabilität in Lösung, bei gleichzeitiger geringer Toxizität für die Zelle in Kombination mit außergewöhnlich guten Transfektionseigenschaften.

So konnte gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen, im Vergleich mit Lipofectamin™ (Gibco-BRL : Life Technologies Inc.), dem bis dato in der Fachwelt anerkannt wirksamsten Transfektionsreagenz aus der Gruppe der Lipopolyamine, bessere Transfektionseigenschaften besitzen, wenn sie die gleiche Kopfgruppe tragen. Die Transfektionseffizienz ist dabei nicht nur jeweils im serumfreien und serumhaltigen Milieu höher, sondern es zeigt sich auch, daß ein hohes Niveau der Transfektionseffizienz über ein wesentlich breiteres DNA-Lipid-Verhältnis erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können dadurch hergestellt werden, daß eine Aminogruppe eines Diamins gegebenenfalls in Gegenwart einer Base mit einem Alkylierungsreagenz umgesetzt und die andere Aminogruppe mit einem gegebenenfalls BOC-geschützten Carboxypolyalkylamin gekuppelt wird. Dabei ist die andere Aminogruppe vorzugsweise im ersten Reaktionsschritt z.B. mit einer BOC-Gruppe geschützt, die vor Umsetzung mit dem Carboxypolyalkylamin entfernt wird. Als Alkylierungsreagenz kann ein Alkylbromid wie Stearyl bromid eingesetzt und als Base z.B. Triethylamin oder 4-Methylmorpholin eingesetzt werden.

Nachstehend wird ein entsprechender Syntheseweg am Beispiel einer der ganz besonders interessanten Verbindungen, nämlich von N-[2,5-Bis [(3-aminopropyl) amino]-1-oxopentyl]-N',N'-dioctadecylethylendiamin, erläutert.

Dabei wird von Alkylendiamin ausgegangen, bei dem eine Aminogruppe mit N-tert.-Butyloxycarbonyl geschützt (BOC geschützt) ist. Die freie Aminogruppe wird durch Alkylbromide wie z.B. Stearyl bromid in Anwesenheit einer Base derivatisiert. Anschließend wird die geschützte Aminofunktion in an sich üblicher Weise deblockiert und in an sich üblicher Weise an an allen (reaktiven) Aminofunktionen BOC-geschütztes Carboxypolyalkylamin (hier BOC-geschütztes Carboxyspermin) gekuppelt. Nach in an sich üblicher Weise erfolgreichem Deblockieren dieser Kopfgruppe erhält man die gewünschten Verbindungen, je nach Aufarbeitung als freies Amin oder in Form ihrer Salze.

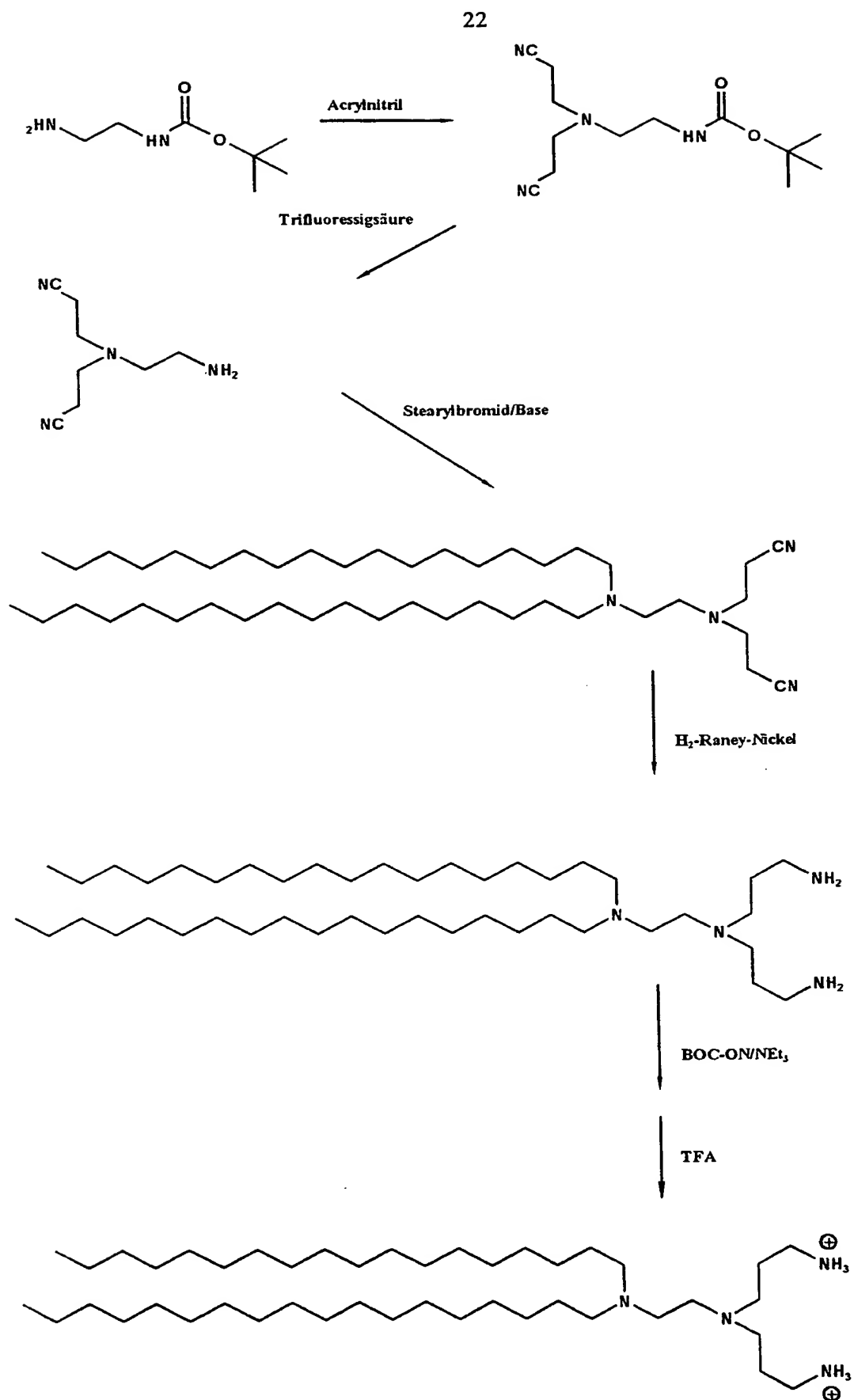


In einer weiteren Ausführungsform wird ein gegebenenfalls an einer Aminogruppe geschütztes Diamin mit Acrylnitril umgesetzt und das Produkt mit einem Alkylierungsreagenz, wie Stearyl bromid, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base umgesetzt. Das Produkt kann dann hydriert werden.

So kann eine weitere bevorzugte Verbindung, nämlich N,N-Bis-(3-aminopropyl)-N',N'-dioctadecylethylendiamin hergestellt werden. Diese Verbindung wird ausgehend von N-tert.-

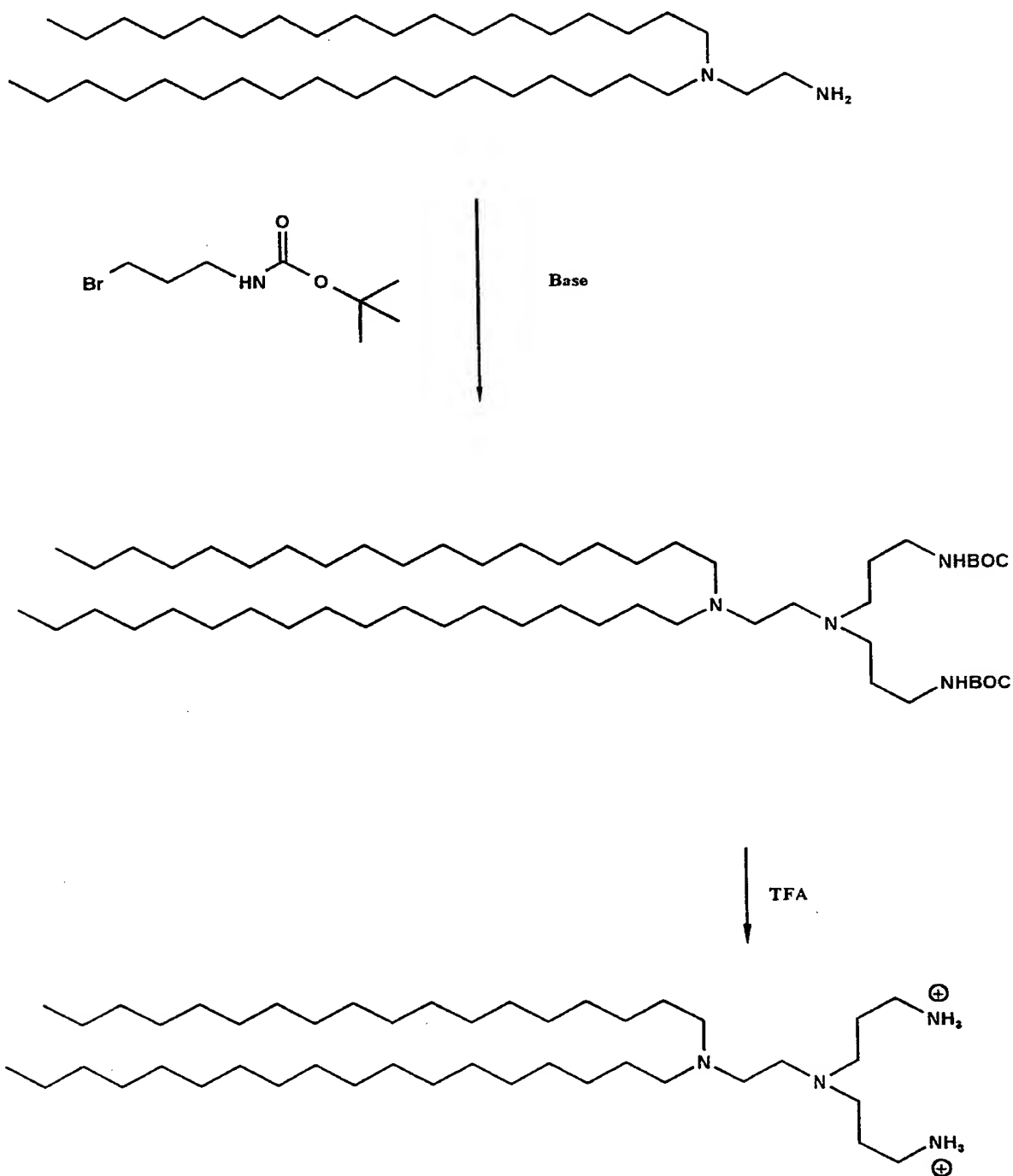
21

Butyloxycarbonylethylendiamin (BOC-Ethylendiamin) durch Umsetzen mit Acrylnitril, Alkylierung mit Alkylbromid und anschließender Hydrierung gewonnen. Die anschließenden Schritte dienen der Aufreinigung.

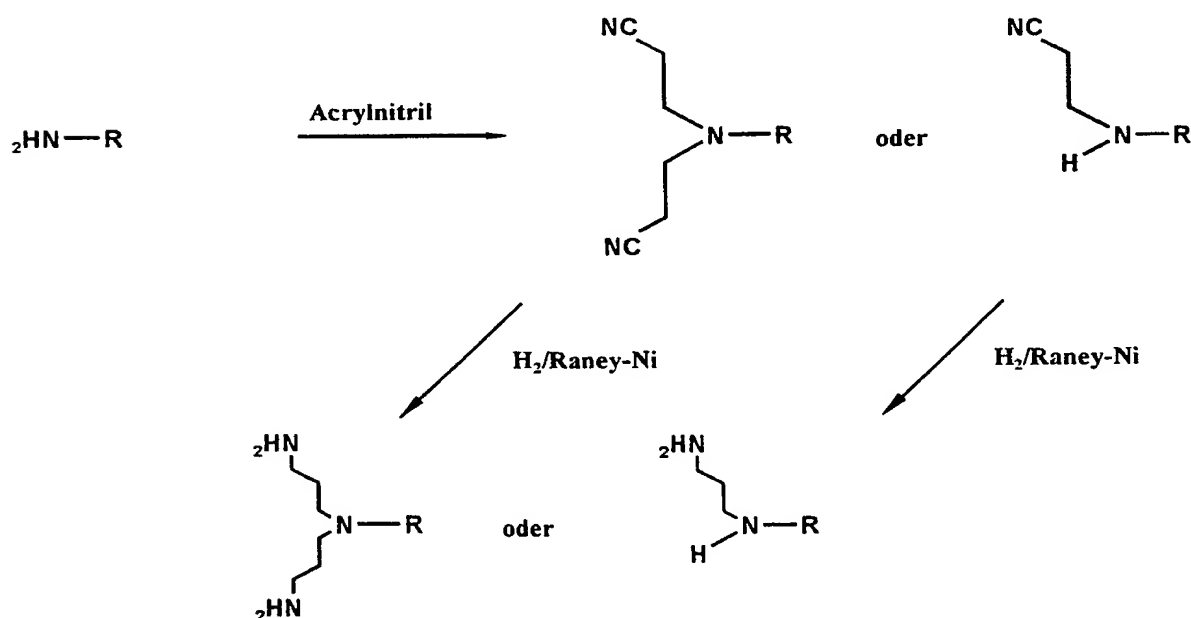


23

Ein alternativer Weg zum gleichen Molekül ist die Alkylierung von N,N-Dioctadecylethylen-diamin mit N-BOC-3-brompropylamin:

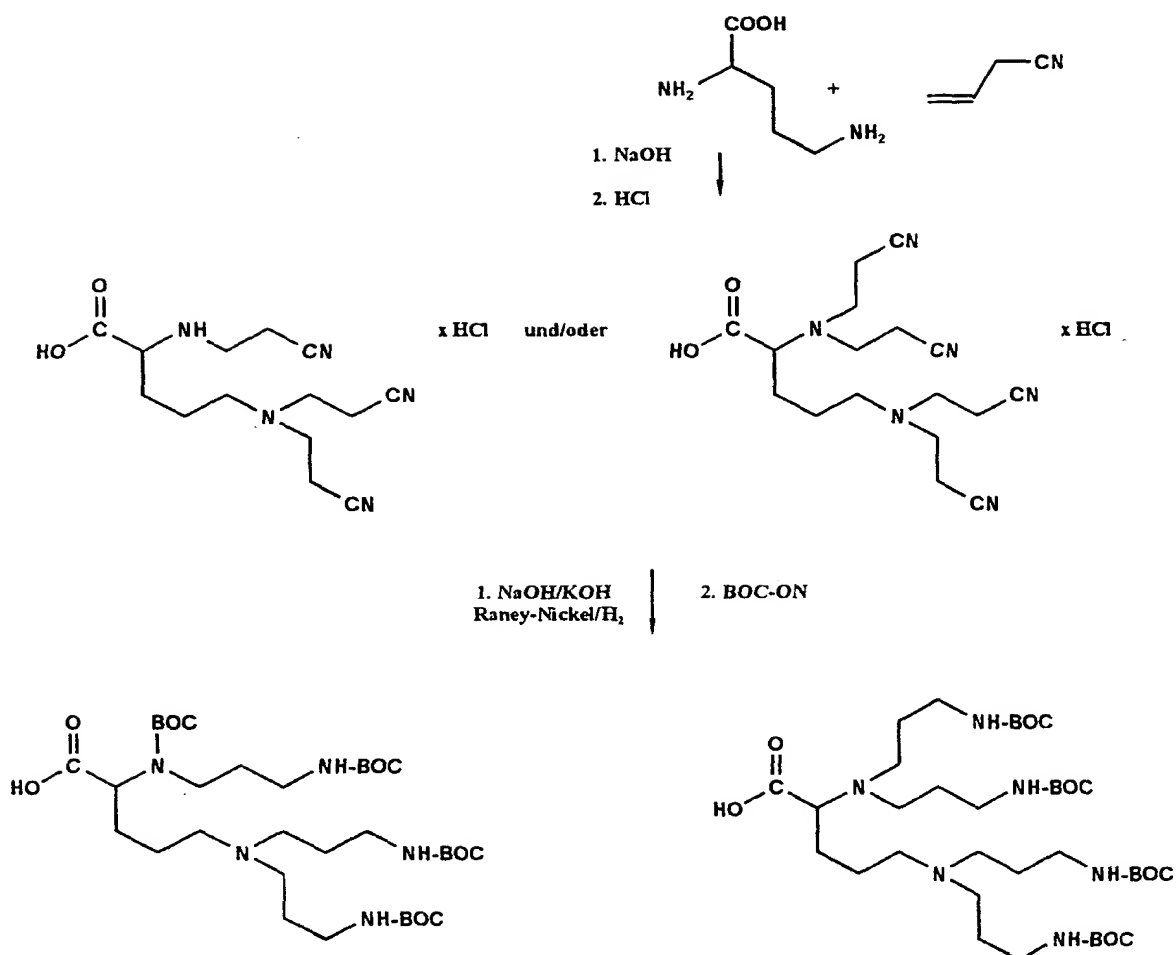


Durch Wahl dem Fachmann an sich bekannter geeigneter Bedingungen, wie Temperatur, Zeit, stöchiometrisches Verhältnis etc. können die Polyaminkopfgruppen verlängert oder auch verzweigte Polyaminkopfgruppen erzeugt werden. Dabei besteht die Möglichkeit, die Kopfgruppe einzeln zu erzeugen und anschließend an den lipophilen Rest zu koppeln oder schon gekoppelte Kopfgruppen am Molekül zu erweitern. Z.B. kann nach folgendem an sich bekanntem Reaktionsschema, das im übrigen auch im vorigen Beispiel enthalten ist, vorgegangen werden:

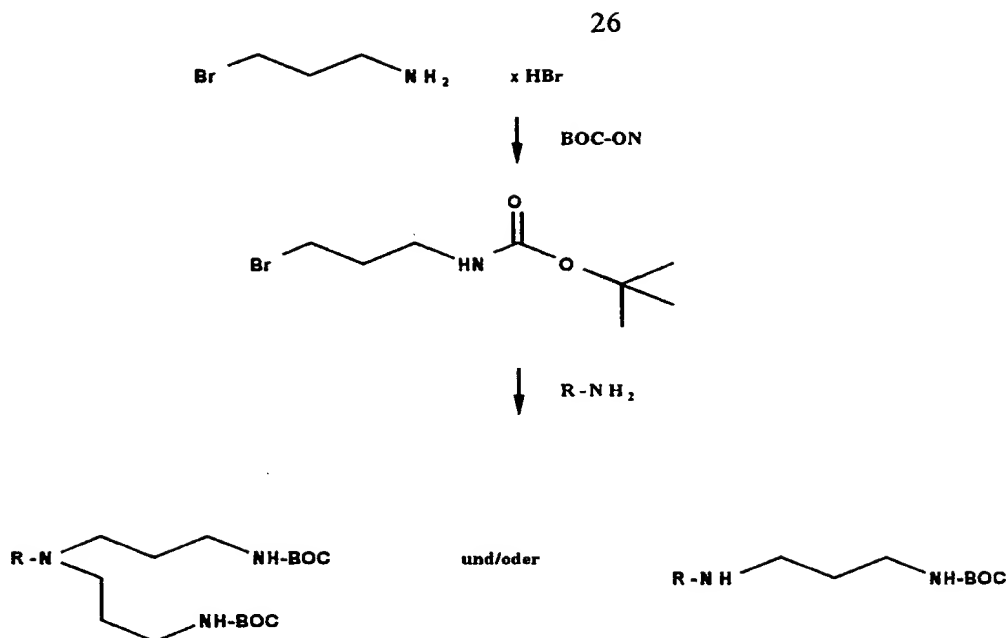


Als explizites Beispiel soll die Umsetzung von Ornithin mit Acrylnitril dienen. Über die Menge an Acrylnitril und der richtigen Wahl der Reaktionstemperatur kann das gewünschte Produkt als Hauptmenge erhalten werden. Die Hydrierung der Nitrile zu den Aminen und deren Schutz durch die BOC-Schutzgruppe werden nach J. P. Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, pp. 6982-6986, 1989 analog der Synthese von Tetra-BOC-Carboxyspermin durchgeführt.

25



Eine weitere Möglichkeit zur Verlängerung und Verzweigung der Polyaminkopfgruppen besteht in der Alkylierung von Aminen durch N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-3-brompropylamin:



Allgemein können sämtliche aufgeführten Lipide mit den in den vor- und nachstehenden Beispielen aufgeführten Methoden (Blockieren und Deblockieren von Aminofunktionen mit der BOC-Schutzgruppe, Alkylierung von Aminofunktionen mit Alkylbromiden, Knüpfen von Amidbindungen analog bekannter Peptidchemie, Cyanoethylierung von Aminofunktionen via Acrylnitril, Hydrierung von Cyanofunktionen zu Aminen) oder mit dem organischen Chemiker vertrauten, allgemein bekannten Methoden (Alkylierung von Alkoholen, Knüpfen von Esterbindungen, Reduktion von Estern zu Ethern bzw von Amiden zu Aminen via Lithiumalanat) erzeugt werden.

Bezüglich der Herstellung der Verbindungen, die die zwei zuletzt beschriebenen Spacer enthalten, sei auf WO 9802191 verwiesen. Hier wird beschrieben, wie Ester und Amide mit Lithiumalanat zu Ethern und Aminen reduziert werden können, ohne die BOC-Schutzgruppe anzugreifen. Auf diesem Wege resultieren solche Verbindungen aus den entsprechenden Vorläufern.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können als solche in wässriger oder wässriger Puffer- oder ethanolischer Lösung angewendet werden. Es können jedoch auch Liposomen (oder Micellen) mit den oben genannten Lipiden allein, oder in Kombination mit anderen Lipiden wie zum Beispiel Cholesterol, Cholesterylamin, Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) formuliert werden.

Um die Transfektionseffizienz der erfindungsgemäßen Lipide zu steigern, besteht die Möglichkeit, Zellen in Gegenwart von Substanzen zu transfektieren, die die enzymatische Aktivität in

den Lysosomen inhibieren, sogenannte lysosomatotrope Substanzen, wie zum Beispiel Chloroquin oder von Viren abgeleitete lysosomatropisch wirkende Proteine.

Weiter besteht die Möglichkeit, sogenannte Enhancer in Kombination mit den kationischen Lipiden einzusetzen. Enhancer verstärken die Wirkung der kationischen Lipide. Dabei gibt es Enhancer, die selbst keine transfizierenden Eigenschaften besitzen, und solche, die auch ohne kationische Lipide zur Transfektion verwendet werden können. Im ersten Fall kommt es zu einer einfachen Verstärkung (Amplifikation) der Transfektionseffizienz der kationischen Lipide. In letzterem Fall zeigt sich in kombinierter Anwendung eine Transfektionseffizienz, die größer ist als bei Einzelanwendung. Die Kombinationswirkung kommt daher durch einen Synergieeffekt zustande. Enhancer entfalten ihre Wirkung in der Regel durch eine Vorkondensation der zu transfizierenden DNA oder sie Erhöhen die Permeabilisierbarkeit der zu durchdringenden Zellmembran. Beispiele für Enhancer sind Polyethylenimin, Transferrin, Protaminsulfat, Polyhistone, fusogene Peptide, Virushüllen, virale Oberflächenpeptide, replikationsdefiziente Viren usw.

Die erfindungsgemäßen Lipopolyamine sind bei physiologischem pH positiv geladen und können daher mit negativ geladenen Makromolekülen, insbesondere mit DNA und verwandten Stoffklassen stabile Aggregate bilden. Die mit den Lipopolyaminen bemantelten und positivierten Makromoleküle wechselwirken mit der negativ geladenen Zellmembran auf eine Weise, die zu einer Einschleusung der Makromoleküle in die Zelle führt. Dabei sind in vitro als auch in vivo Anwendungen möglich.

Im Vergleich zur zielgerichteten rezeptorvermittelten Endocytose (Wu et al., J. Chem. 262, 4429-4432, 1987), in denen Polykationen, welche auch DNA-Binder genannt werden (zum Beispiel Polylysin etc.) an sogenannte Internalisierungsfaktoren (zum Beispiel bestimmte Glykoproteine) gebunden sind, die zielgerichtet an Oberflächenrezeptoren bestimmter Zellen binden, besitzen die erfindungsgemäßen Lipide, bzw. deren Liposomenformulierungen keine Zellspezifität. Eine zielgerichtete Lieferung durch die erfindungsgemäßen Lipide bzw. deren Liposomenformulierungen kann dadurch erreicht werden, daß die Ladungen von Lipiden und den zu transportierenden Biomolekülen ausgeglichen werden und zusätzlich an das Aggregat zwischen Biomolekül und Lipiden Internalisierungsfaktoren angebracht werden. Dies kann zum Beispiel durch Liposomenformulierung mit Colipiden erreicht werden, falls die Colipide als Kopfgruppe solche Internalisierungsfaktoren tragen. Eine andere Möglichkeit ist ein auf Ladungsneutralität abgestimmtes Aggregat aus Biomolekül, Lipiden und Internalisierungsfaktoren. Sogenannte Internalisierungsfaktoren sind Transferrin, Galactose, Mannose, Mannose-6-phosphat, Asialglycoprotein, Conalbumin, Lectine, Transcobalamin, α -2-Makroglobulin, Bio-

tin, Folat, mannosylierte Glycoproteine. Weitere sind in EP 0535576, EP 0544292, WO 9421808 zu entnehmen, die hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

Analog wie Internalisierungsfaktoren, können auch zellspezifische Antikörper eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zu Therapie Zwecken eingesetzt werden. Insbesondere können solche Verbindungen für die Gentherapie von zum Beispiel Cystischer Fibrose, Muskeldystrophie, Phenylketonurie, Ahornsirupkrankheit, Propionazidämie, Methylmalonazidämie, Adenosindeaminasemangel, Hypercholesterinämie, Hämophilie und β -Thalassämie genutzt werden. Gentherapeutische Behandlungsmethoden sind weiters interessant, wenn Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytotoxine oder immunomodulierend wirkende Proteine im Organismus synthetisiert werden sollen. Für die oben genannten Zwecke können DNA-Fragmente mittels dieser Lipide in Zellen gebracht werden, in denen diese DNA die gewünschte Wirkung entfaltet. Die gewünschte Wirkung kann der Ersatz fehlender oder defekter DNA-Bereiche oder die Inhibition von DNA-Bereichen (zum Beispiel Antisense-DNA / RNA), die die Erkrankung auslösen, im erkrankten Zelltyp sein. Auf diese Weise können tumorunterdrückende Gene in der Krebs-Therapie eingesetzt werden oder durch die Einführung cholesterolregulierender Gene ein Beitrag zur Vorbeugung von Herz- und Blutgefäßkrankheiten leisten. Weiter kann DNA, welche Ribozyme kodiert, oder Ribozyme selbst in erkrankte Zellen eingeschleust werden. Die Translation jener DNA erzeugt aktive Ribozyme, die an spezifischen Stellen mRNA katalytisch spalten und auf diese Weise die Transkription verhindern. Auf diese Weise kann zum Beispiel virale m-RNA spezifisch gespalten werden, ohne eine andere zelluläre mRNA in Mitleidenschaft zu ziehen. Der Vermehrungszyklus von Viren (z.B. HIV, Herpes, Hepatitis) kann auf diesem Wege unterbrochen werden.

Auch in der Krebstherapie spielt Transfektion zur Herstellung von Krebsvakzinen eine immer größer werdende Rolle. Damit ist dieses Feld auch mögliches Anwendungsgebiet für die erfindungsgemäßen Verbindungen.

Eine weitere Anwendung können solche Lipide zum Beispiel in Impfverfahren finden, die auf der Basis der Expression von DNA, welche immunogene Peptide kodiert, im Körper von Mensch und Tier funktionieren. Dazu werden Lipid / DNA-Komplexe als Impfstoffe benutzt. Die Einschleusung der DNA in die Körperzellen führt zur Expression des immunogenen Peptids und löst somit die Immunantwort aus.

Abgesehen von DNA können auch andere Makromoleküle, wie zum Beispiel PNA, Peptide, Peptoide oder Proteine, in Zellen eingeschleust werden. Zu diesem Zweck können sie mit den erfindungsgemäßen Lipopolyaminen als solche bemäntelt werden oder in Liposomen, welche

als Komponente die erfindungsgemäßen Lipopolyamine enthalten, eingeschlossen oder an deren Oberfläche adsorbiert werden, falls eine negative Nettoladung vorhanden ist. Bringt man derartige Aggregate mit Zellen in Kontakt, so findet ein Transport dieser Moleküle durch die Zellwand statt. Therapeutische Peptide haben einen günstigen Einfluß auf zahlreiche Erkrankungen. Solche Peptide oder Proteine sind zum Beispiel Lymphokine, Interleukine, Tumornekrose Faktoren oder Interferone, weiterhin Wachstumsfaktoren, Gewebeplasminogenaktivator, Faktor-VIII:c, Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, Erythropoietin, Insulin, Calcitonin, Thymidinkinase und andere. Auch toxische Peptide wie Ricin, Diphtheriatoxin und andere können therapeutisch auf diese Weise gewinnbringend eingesetzt werden. Peptide können erfolgreich als Peptidanaloga zur Verhinderung eines schnellen enzymatischen Abbaus im Körper eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Lipide werden aufgrund ihrer positiven Ladung vorwiegend dazu eingesetzt, negativ geladene Moleküle wegen ihrer negativen Ladung zu komplexieren und in Zellen einzuschleusen. Durch sogenannte „self assembling systems“ können jedoch auch positiv geladene Moleküle transportiert werden, in dem zunächst negativ geladene Liposomen mit diesem positiv geladenen Molekülen komplexiert werden. Wählt man die Verhältnisse so, daß eine negative Nettoladung verbleibt, können diese Komplexe mit diesen erfindungsgemäßen Lipopolyaminen als solche oder in Form von Liposomen positiviert werden, in dem die gegensätzlich geladenen Komponenten in Kontakt gebracht werden. Die resultierenden positiv geladenen Gesamtkomplexe werden von den Zellen aufgenommen.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten für kationische Lipide sind den Veröffentlichungen WO 9011092, WO 9116024, WO 9303768, Science 258, 744-746, 1992 zu entnehmen, die hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

Beispiele für derzeit als therapeutisch aussichtsreich anzunehmende Sequenzen genetischen Materials sind in der Übersicht von F.W.Anderson, Science 256, 808, 1992 entnehmbar, die ebenfalls hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

Beispiele:

Bezugsquellen:

1. Plasmide: pCMV<Sport> β -Gal; Gibco BRL, Life Technologies
2. β -Galaktosidase-Assay-Kit, Stratagene
3. Tetra-BOC-Carboxyspermin wurde nach J.-P. Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, pp. 6982-6986, (1989) synthetisiert.

4. Lipofectamin™ ; Gibco-BRL : Life Technologies Inc.
5. N-tert.-Butyloxycarbonylethylendiamin, Aldrich.
6. O-(tert.-Butoxycarbonyl)-phenylglyoxyl-säurenitriloxim (BOC-ON); Aldrich.
7. N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Methojodid (EDC), Aldrich.
8. 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt), Aldrich.
9. 4-Methylmorpholin, Diisopropylethylamin (DIPEA), Triethylamin, Aldrich.
10. Trifluoressigsäure (TFA), Aldrich.
11. Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM), Gibco-BRL : Life Technologies Inc.
12. Fötales Kälberserum (FCS), Biochrom.
13. Penicillin, Streptomycin, SIGMA.

Beispiel 1: Transfektionsreagenz 1

Synthese von N-tert.-Butyloxycarbonyl-N',N'-dioctadecylethylendiamin

646 mg (1.94 mmol, MG 333.4) Octadecylbromid, 135 mg (0.84 mmol, MG 160.22) N-tert.-Butyloxycarbonylethylendiamin (BOC-ethylendiamin) und 332 µl (1.94 mmol, MG 129.25, d 0.755) Diisopropylethylamin (DIPEA) werden in 10 ml Acetonitril gelöst und über Nacht unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von 100 ml Ether wird mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel abgezogen. Das schon relativ saubere Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

$C_{43}H_{88}O_2N_2$

MG 664.12

$R_f = 0.44$ (9:1 v/v Chloroform/Methanol)

MS (FAB): 665.7 (M + 1)

1H - NMR ($CDCl_3$):

0.88 (tr, 6 H, CH_3); 1.26 („s“, 60 H, CH_2); 1.40 (m, 4 H, $N-CH_2CH_2$); 1.44 (s, 9 H, CH_3BOC); 2.40 (tr, 4 H, $N-CH_2$); 2.50 (tr, 2 H, $N-CH_2$); 3.15 (m, 2 H, $OCO-N-CH_2$).

^{13}C - NMR ($CDCl_3$):

13.1 (CH_3); 22.7, 27.0, 25.5 (CH_2); 28.5 (CH_3BOC); 29.4, 29.6, 29.7, 29.7 (CH_2); 53.2 ($N-CH_2$); 54.0 ($N-CH_2$); 78.9 (C_{qBOC}); 156.1 (OCO).

Ausbeute: 390 mg (69 %)

Synthese von N-[Tetra-tert.-butyloxycarbonyl-[(2,5-bis(3-aminopropyl)amino)-1-oxopentyl]]-N',N'-dioctadecylethylendiamin

157 mg (0.236 mmol, MG 665.12) N-tert.-Butyloxycarbonyl-N',N'-Dioctadecylethylendiamin werden in 4 ml eines 1:3 v/v Gemisches aus Trifluoressigsäure (TFA) und Methylenchlorid aufgenommen. Nach 2-3 h wird abrotiert und 0.5 h am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird in 6 ml eines 1:1 v/v Gemisches aus DMF und Methylenchlorid aufgenommen und mit 300 µl 4-Methylmorpholin versetzt. Anschließend werden 152.6 mg (0.236 mmol, MG 646.8) Tetra-BOC-Carboxyspermin in 2 ml eines 1:1 v/v Gemisches aus Dimethylformamid (DMF) und Methylenchlorid gelöst und zugegeben. Weiterhin werden 45 mg (0.330 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) und 98 mg (0.330 mmol) N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Methojodid (EDC) zugegeben und 50 h bei RT gerührt. Die Lösungsmittel werden abrotiert und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Danach wird mit Wasser gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und abrotiert. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie gereinigt.

$C_{51}H_{136}N_6O_9$

MG 977.65

$R_f = 0.40$ (9:1 v/v Methylenchlorid/Methanol)

1H - NMR ($CDCl_3$):

0.88 (tr, 6 H, CH_3); 1.25 („s“, 64 H, CH_2); 1.44 (m, 36 H, CH_3BOC); 1.67 (m, 8 H, Spermin: $CH_2CH_2CH_2$); 2.36 (mr, 4 H, Stearyl: N- CH_2); 2.51 (m, 2 H, Ethylendiamin: N- CH_2); 3.1-3.25 (m, 10 H, OC-N- CH_2).

Ausbeute: 135 mg (59 %)

Synthese von N-[2,5-Bis((3-aminopropyl)amino)-1-oxopentyl]-N',N'-dioctadecylethylen-diamin (TFA-Salz)

70 mg N-[Tetra-tert.-butyloxycarbonyl-[(2,5-bis(3-aminopropyl)amino)-1-oxopentyl]]- N',N'-dioctadecylethylendiamin werden in 2 ml eines Gemisches aus Methylenchlorid und Trifluoressigsäure (3:1 v/v) gelöst und 1.5 h bei RT gerührt. Danach wird abrotiert, in 10 ml eines Gemisches aus Wasser/ tert.-Butanol (1:1 v/v) aufgenommen und lyophilisiert.

$C_{53}H_{104}ON_6$ (x 4 CF_3COOH)

MG 793.52 (+ 4 x 114 = 1249.52)

Ausbeute: 100 %

Beispiel 2: Transfektionreagenz 2

Synthese von N',N'-Bis-(2-cyanoethyl)-N-tert.-butyloxycarbonylethylendiamin

500 mg (3.12 mmol, MG 160.22) N-tert.-Butyloxycarbonylethylendiamin werden in 5 ml Wasser gelöst und 0.65 ml (9.8 mmol, MG 53.06) Acrylnitril zugegeben. Danach wird 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit Essigester überschichtet, ausgeschüttelt und die organische Phase abgetrennt. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird abrotiert.

$C_{13}H_{22}O_2N_4$

MG 266.34

$R_f = 0.69$ (9:1 v/v Chloroform/Ethanol)

Ausbeute: 660 mg (80%)

Synthese von N',N'-Bis-(2-cyanoethyl)-N,N-dioctadecylethylendiamin

660 mg (2.48 mmol, MG 266.34) N',N'-Bis-(2-cyanoethyl)-N-tert.-butyloxycarbonylethylendiamin werden in 10 ml eines 1:3 v/v Gemisches aus Trifluoressigsäure und Methylenchlorid aufgenommen. Nach 2-3 h wird abrotiert und 0.5 h am Hochvakuum getrocknet. Danach wird aus Butanol/Wasser (1:1 v/v) lyophilisiert. Das erhaltene Trifluoracetat wird in 40 ml trockenen Acetonitril zusammen mit 2.43 g (7.28 mmol, MG 333.4) Octadecylbromid und 2.23 ml (1.68 g, 13.02 ml, MG 129.25, d 0.755) Diisopropylethylamin (DIPEA) gelöst und 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie gereinigt.

$C_{44}H_{86}N_4$

MG 671.16

$R_f = 0.42$ (9:1 v/v Methylenchlorid/Methanol)

1H - NMR ($CDCl_3$):

0.88 (tr, 6 H, CH_3); 1.26 (s, 60 H, CH_2); 1.42 (m, 4 H, N- CH_2CH_2) 2.42 (m, 4 H, N- CH_2); 2.48 (tr, 4 H, CH_2-CN); 2.50 (m, 2 H, N- CH_2); 2.50 (m, 2 H, N- CH_2); 2.92 (tr, 4 H, N- CH_2).

Ausbeute: 330 mg (20%)

Synthese von N',N'-Bis-(3-aminopropyl)-N,N-dioctadecylethylendiamin (TFA-Salz)

2.5 g Raney-Nickel werden zu 50 ml Wasser gegeben. Dazu wird unter Rühren 4.5 g Natriumhydroxid so schnell zugegeben, daß das Wasser gerade nicht überkocht und anschließend eine halbe Stunde gerührt. 320 mg (0.48 mmol, MG 671.2) N',N'-Bis-(2-cyanoethyl)-N,N-dioctadecylethylendiamin werden in 500 ml 0.5 M Kaliumhydroxidlösung (in EtOH/Wasser 95:5 v/v) aufgenommen. Das aktivierte Raney-Nickel wird vom Überstand durch abdekantieren getrennt und zur Eduktlösung gegeben. Danach wird 24 Stunden an einer Hydrieranlage hydriert. Nach Einrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in 5 ml Methylenchlorid gelöst. Dazu werden 500 mg (2.02 mmol, MG 246.27) O-(tert.-Butoxycarbonyl)-phenylglyoxyl-säurenitriloxim (BOC-ON) gegeben und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Danach wird einrotiert. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie gereinigt. Danach wird das Produkt in 10 ml eines 1:3 v/v Gemisches aus Trifluoressigsäure und Methylenchlorid aufgenommen. Nach 2-3 h wird abrotiert und 0.5 h am Hochvakuum getrocknet. Zuletzt wird aus Butanol/Wasser (1:1 v/v) lyophilisiert.

$C_{44}H_{94}N_4 \times 4 CF_3COOH$

MG 679.21 (+4 x 114 = 1135.21)

MS (ESI): 680.2

Ausbeute: 250 mg (58% bezogen auf Nitril)

Beispiel 3: Verzweigte Kopfgruppen:

Synthese von N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-3-brompropylamin

500 mg (2.28 mmol; MG 218.94) 3-Brom-1-propylamin Hydrobromid (Aldrich) werden zusammen mit 1.13 (4.59 mmol; MG 246.27) O-(tert.-Butoxycarbonyl)-phenylglyoxyl-säurenitriloxim (BOC-ON) und 0.65 ml (0.46 g; 4.6 mmol) Triethylamin in einem Gemisch aus Aceton und Wasser (1:1, v/v) gelöst. Nach 2 Stunden Rühren wird eingengt und in Methylenchlorid aufgenommen. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

$C_8H_{16}O_2NBr$

MG 238.31

$R_f = 0.84$ (9:1 v/v Methylenchlorid/Methanol)

1H - NMR ($CDCl_3$):

1.36 (br s, 9 H, CH_3BOC); 1.98 (m, 2 H, C- CH_2 -C); 3.19 (m, 2 H, Br- CH_2); 3.38 (m, 2 H, N- CH_2); 4.90 (br s, 1 H, N-H).

^{13}C - NMR ($CDCl_3$):

28.2 (CH_3); 30.6, 32.6, 38.8 (CH_2); 79.1 (C_q); 155.8 ($C=O$).

Ausbeute: 250 mg (46 %)

Synthese von N',N'-Bis-(3-aminopropyl)- N,N-diocetadecylethylendiamin (TFA-Salz)

200 mg (0.3 mmol, MG 665.12) N-tert.-Butyloxycarbonyl-N',N'-diocetadecylethylendiamin werden in 2 ml eines Gemisches aus Trifluoressigsäure und Methylenchlorid (1:3 v/v) gelöst. Nach zwei Stunden wird abrotiert und 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet. Danach wird in 20 ml Chloroform aufgenommen und 1 ml (920 mg, 4.5 mmol, MG 101.15, d = 0.92) 4-Methylmorpholin zugegeben. Anschließend werden 640 mg (2.68 mmol, MG 238.13) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-3-brompropylamin zugegeben. Nach 48 Stunden Kochen unter Rückfluß wird einrotiert und das BOC-geschützte Vorläufer produkt durch Flashchromatographie gereinigt. Abschließend wird in 2 ml ml eines Gemisches aus Trifluoressigsäure und Methylenchlorid (1:3 v/v) gelöst, einrotiert und lyophilisiert.

$C_{44}H_{94}N_4 \times 4 CF_3COOH$

MG 679.21 (+4 x 114 = 1135.21)

MS (ESI): 680.2

Ausbeute: 46 mg (13 %)

Synthese von N,N',N'-Tris (cyanoethyl)-ornithin

950 mg Natriumhydroxid werden in 20 ml Wasser gelöst. In der Natronlauge werden 2 g (11.86 mmol, MG 168.62) Ornithin Hydrochlorid gelöst. Danach werden 3 ml (45.57 mmol)

Acrylnitril zugetropft und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 1.7 ml 25%iger Salzsäure fällt ein Feststoff aus. Dieser wird nach Kühlung abgenutscht.

$C_{14}H_{21}O_2N_5 \times HCl$

MG 327.82

$R_f = 0.71$ (1:1:1 v/v/v Isopropanol/Ethanol/Wasser)

1H - NMR (D_2O):

1.58 (m, 2 H, $\underline{CH_2}$ - CH_{Om}); 1.90 (m, 2 H, CH_{2Om}); 2.61 (m, 6 H, NC- $\underline{CH_2}$); 2.86 (tr, 4 H, N- $\underline{CH_2}$); 2.98 (tr, 2 H, N- $\underline{CH_2}$ - $\underline{CH_2}$); 3.39 (tr, 2 H, , N- $\underline{CH_2}$); 3.68 (tr, 1 H, CH_{Om}).

Ausbeute: 2.1 g (54 %)

Synthese von N,N,N',N'-Tetra (cyanoethyl)-ornithin

980 mg Natriumhydroxid werden in 20 ml Wasser gelöst. In der Natronlauge werden 2 g (11.86 mmol, MG 168.62) Ornithin Hydrochlorid gelöst. Danach werden 3.9 ml (59.3 mmol) Acrylnitril zugetropft und 8 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden nochmals 3 ml Acrylnitril zugetropft und weitere 6 Stunden gerührt. Nach der Zugabe von 1.7 ml 25%iger Salzsäure wird das Produkt 3 x mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert.

$C_{17}H_{24}O_2N_6 \times HCl$

MG 344.4182

$R_f = 0.84$ (1:1:1 v/v/v Isopropanol/Ethanol/Wasser)

1H - NMR (D_2O):

1.60 (m, 2 H, $\underline{CH_2}$ - CH_{Om}); 1.92 (m, 2 H, CH_{2Om}); 2.52 (m, 8 H, NC- $\underline{CH_2}$); 2.61 (tr, 4 H, CH_{2Om}); 2.87 (tr, 4 H, , N- $\underline{CH_2}$); 3.03 (tr, 4 H, N- $\underline{CH_2}$); 3.38 (m, 1 H, CH_{Om}).

Ausbeute: 2.4 g (59 %)

Beispiel 4:

Liposomen/Micellenformulierung

Dioleoylphosphatidylethanolamin, Dioleoylphosphatidylcholin, Cholesterol oder Cholesterylamin werden in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Chloroform) gelöst. Das Lipid aus Beispiel 1 wird als solches oder in Form seines Salzes, zum Beispiel Trifluoracetat-Salzes in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Chloroform) gelöst. Durch Kombination verschiedener Mengen der unterschiedlichen Lösungen werden verschiedene Kompositionen aus Colipiden und kat. Lipid hergestellt. In einem Glaskolben wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers ein dünner Lipidfilm erzeugt. Dieser wird im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Der Film wird mit soviel Wasser oder wässriger Pufferlösung hydratisiert, daß die Konzentration 2 mg Lipid pro ml Lösung beträgt. Danach wird unter Kühlung mit Ultraschall (3 x 15 min) behandelt. Die Formulierung wird durch einen Filter (Porenweite 0.2 µm) sterilfiltriert.

Beispiel 5:

Lipidlösungen

Die Lipide werden als solches und in Form ihrer TFA-Salze mit oder ohne Colipiden in Ethanol gelöst. Durch Mischen mit Wasser erhält man Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzungen.

Beispiel 6:

Zellkulturen

Die Zelllinien CV-1, Hela S3 und NIH 3T3 werden in „Dulbecco's-modified Eagle's medium“ (DMEM), das 10% fötales Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin (Gln), 0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthält, in einem Inkubator (5% CO₂- Atmosphäre) kultiviert.

Beispiel 7:

Transfektion

Die Zellen werden auf einer 12-Well-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von $1-1.5 \times 10^5$ ausplatziert und über Nacht zu annähernd 60-80 % Konfluenz inkubiert. Um die Zellen in einem „Well“ zu transfizieren, werden 1.5 µg von pCMV<Sport>β-Gal in 50 µl serum- und antibioti-

kafreiem DMEM gelöst. Das kationische Lipid (z.B. 3,6,9,12 µl) als ethanolische Lösung oder Liposomenformulierung wird ebenfalls in 50 µl serum- und antibiotikafreiem DMEM gelöst. Die beiden Lösungen werden in einem Polystyrolbehälter gemischt und für 10-15 min stehengelassen, um die Bildung des Lipid/DNA-Komplexes zu ermöglichen.

Währendessen werden die Zellen einmal mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Je nach gewünschten Bedingungen (Transfektion im serumfreien oder serumhaltigen Milieu) werden 0.4 ml antibiotikafreies DMEM mit oder ohne Serum zu den Zellen gegeben. Der DNA/Lipid-Komplex wird direkt zu den Zellen gegeben und im Brutschrank 6 h inkubiert. Danach wird mit serum und antibiotikahaltigem DMEM in der Weise auf 1ml aufgefüllt, daß das Medium eine Endkonzentration von 10 % Serum enthält. Die Zellen werden weitere 20 h kultiviert. Danach wird auf β -Galactosidase nach den Angaben des Herstellers des β -Galaktosidase-Assay-Kits getestet. Das entwickelte O-Nitrophenol wird photometrisch bei 405 nm vermessen.

Resultate

Folgende Tabelle und folgendes Balkendiagramm zeigen Transfektionseffizienzen am Beispiel von Hela S3 Zellen im Vergleich.

Transfektionsreagenz 1:

N-[2,5-Bis((3-aminopropyl)amino)-1-oxopentyl]-N',N'-dioctadecylethylen-diamin (TFA-Salz) wurde als Liposomenformulierung mit 25 Mol % Dioleoylphosphatidylethanolamin in wässriger steriler Lösung eingesetzt. Gesamtlipidmenge: 2 mg/ml.

Transfektionsreagenz 2:

N',N'-Bis-(3-aminopropyl)- N,N-dioctadecylethylen-diamin (TFA-Salz) wurde als Liposomenformulierung mit 50 Mol % Dioleoylphosphatidylethanolamin in wässriger steriler Lösung eingesetzt. Gesamtlipidmenge: 2 mg/ml.

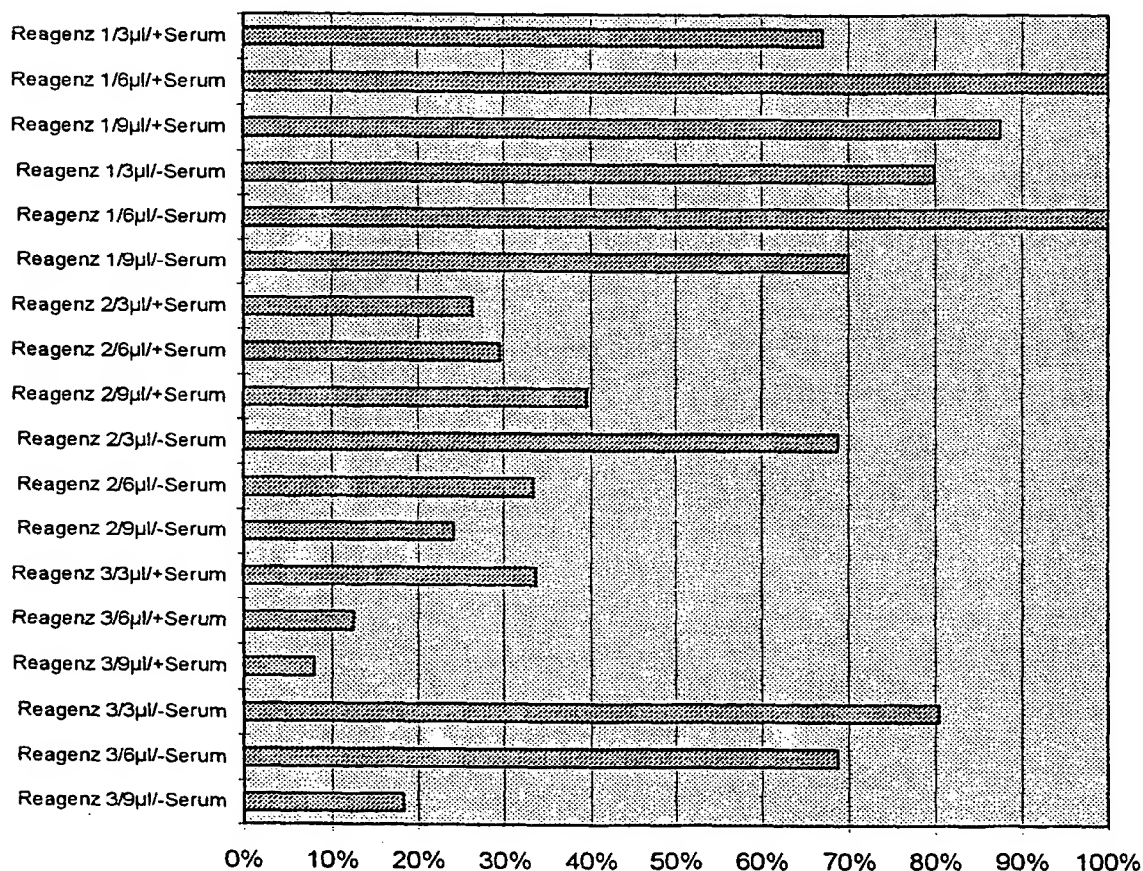
Transfektionsreagenz 3:

Lipofectamin™ (Gibco-BRL : Life Technologies Inc.) wurde vom Hersteller erworben.

Absorbtionswerte bei 405 nm:

	Transfektionsreagenz 1		Transfektionsreagenz 2		Transfektionsreagenz 3	
	mit Serum	ohne Serum	mit Serum	ohne Serum	mit Serum	ohne Serum
3 μ l	1.61	1.92	0.63	1.65	0.81	1.93
6 μ l	2.40	2.40	0.71	0.80	0.30	1.65
9 μ l	2.10	1.68	0.95	0.58	0.19	0.44

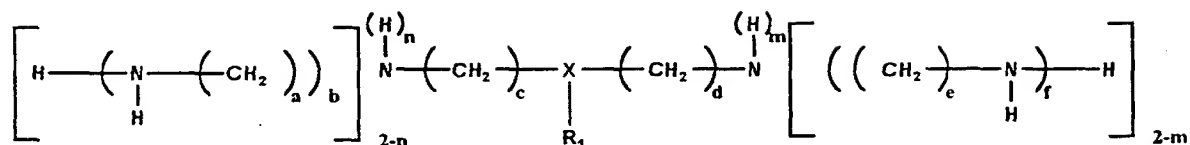
Relative Transfektionseffizienzen



Patentansprüche

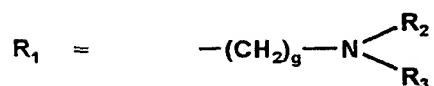
1. Verbindungen der allgemeinen Formel I:

Formel I:



die bei Vorhandensein eines Asymmetriezentrums in der D-,L- oder DL-Form vorliegen, einschließlich ihrer Salze, wobei

R₁ ein lipophiler Rest folgender allgemeiner Formel ist:



in welcher R₂ und R₃ unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl, Octadecenyl sind, oder andere Alkylreste, die gesättigt oder ungesättigt, verzweigt oder unverzweigt, fluoriert oder nicht fluoriert sein können, und aus 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 Kohlenstoffatomen aufgebaut sind ,

und X eine der folgenden Gruppierungen ist:



40

wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

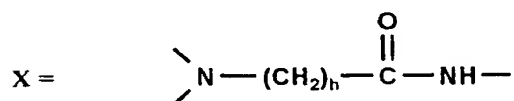
wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

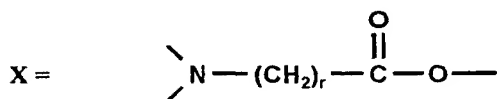
41

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

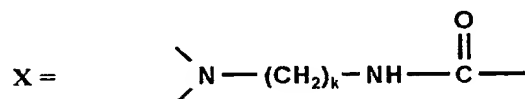
42

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

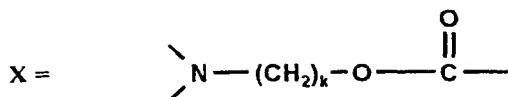
wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

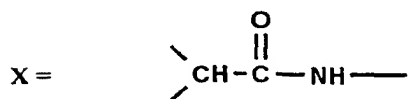
wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

44

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

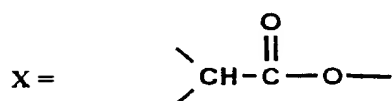
oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

45

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

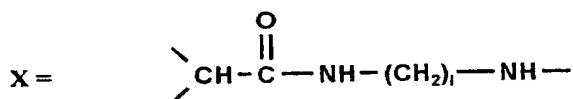
wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

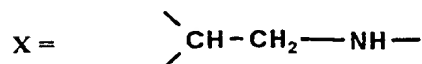
wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder

46

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder

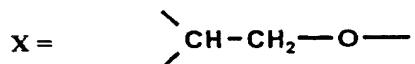
wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder

wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,
oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, oder



wobei $m = 0$ und $n = 0$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 0$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 1$ und $n = 1$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

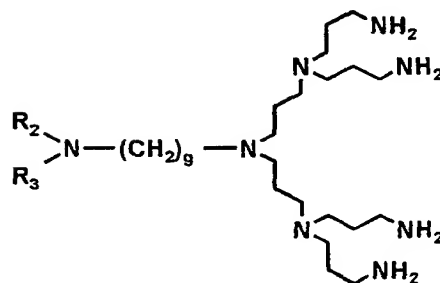
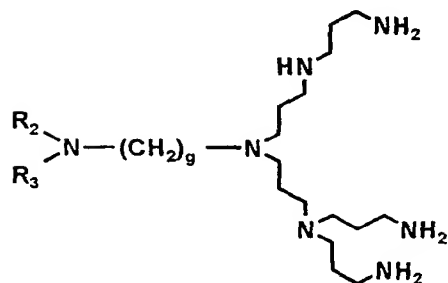
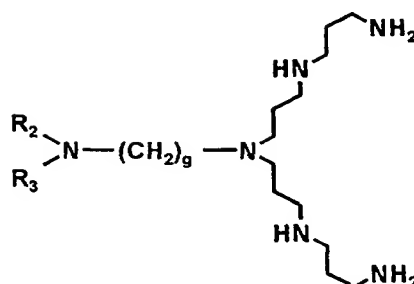
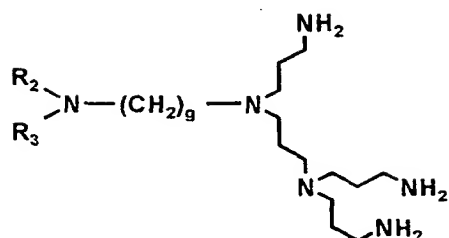
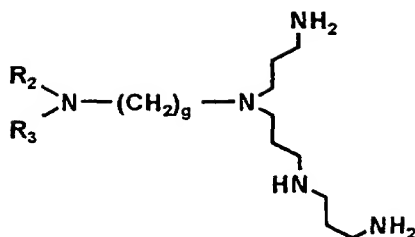
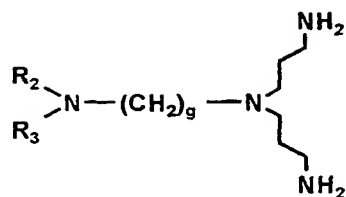
wobei $m = 1$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können,

oder

wobei $m = 2$ und $n = 2$ sind und für diesen Fall $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , $a = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $b = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $c = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $d = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $e = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 , $f = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 sein können, mit der Maßgabe, daß in allen vorstehenden Fällen b kleiner oder gleich 1 ist, wenn $a = 0$ ist und f kleiner oder gleich 1 ist, wenn $e = 0$ ist.

2. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

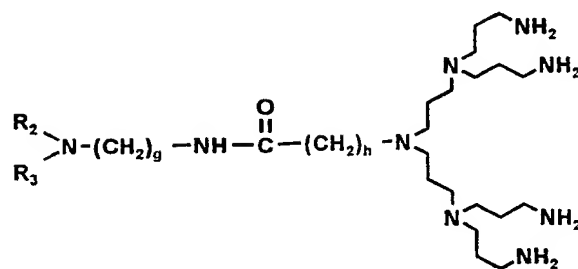
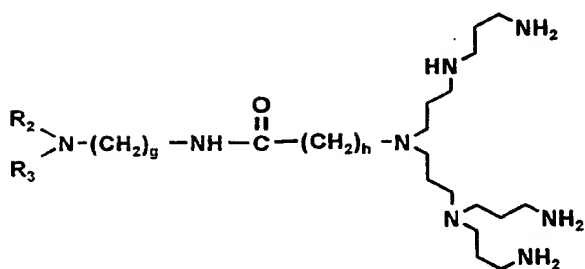
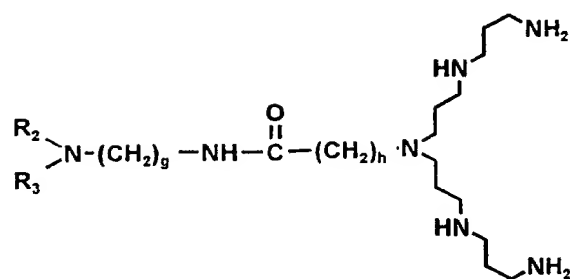
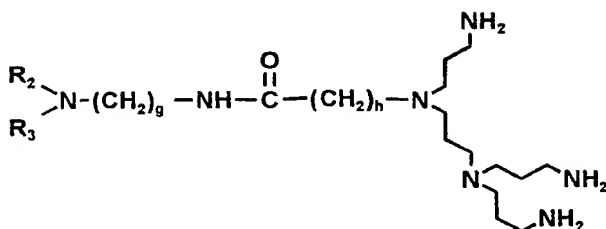
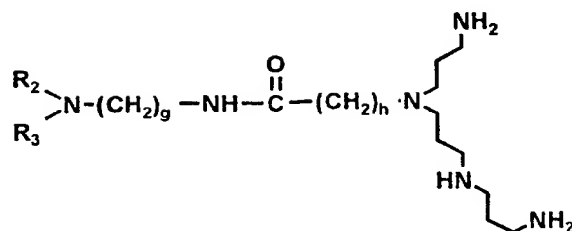
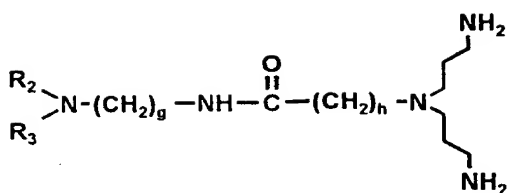
48



wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein kann und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

3. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

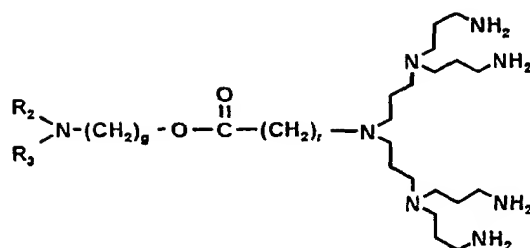
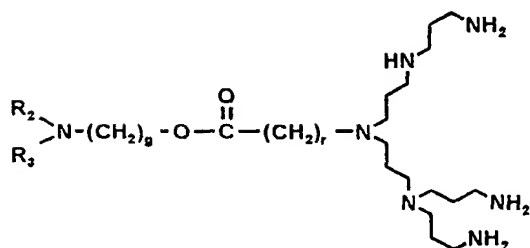
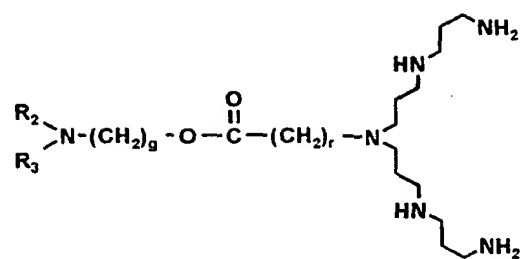
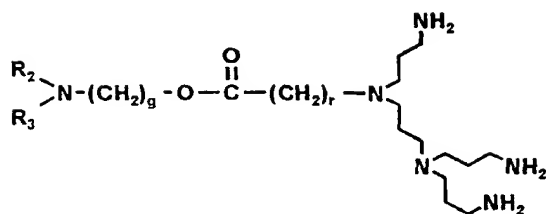
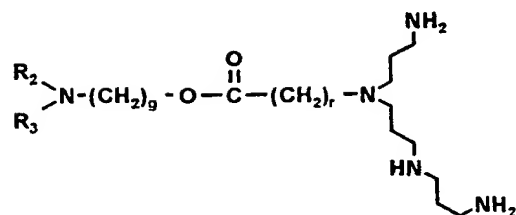
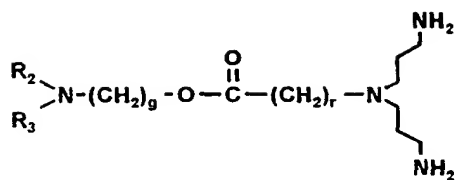
49



wobei $h = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

4. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

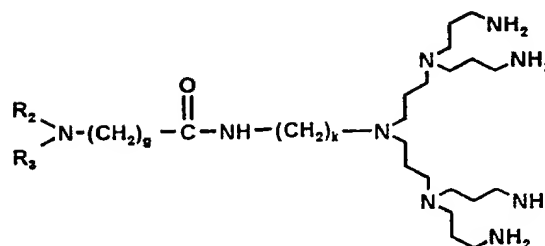
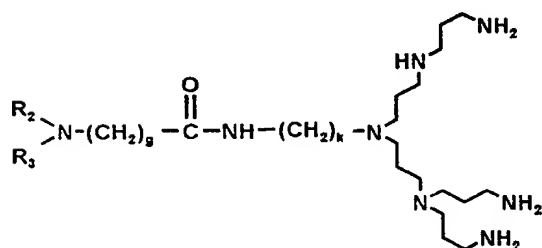
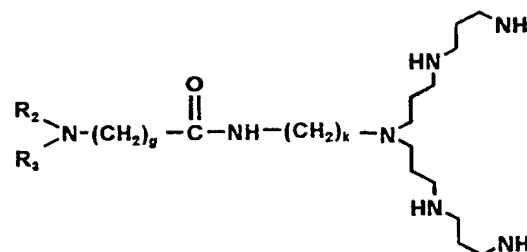
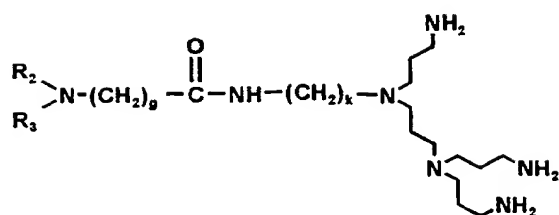
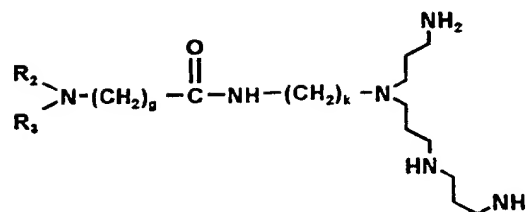
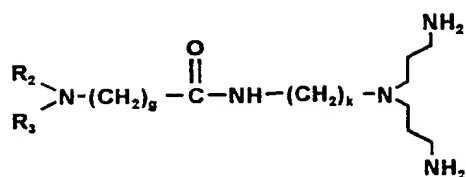
50



wobei $r = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

5. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

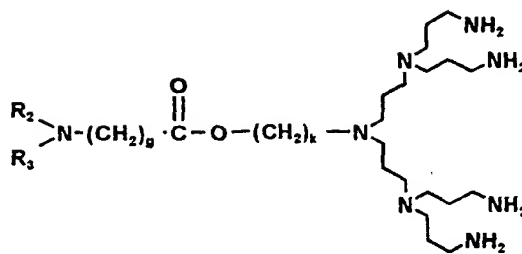
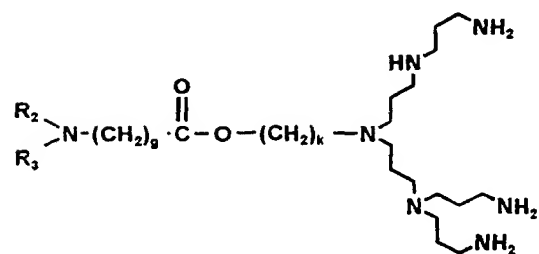
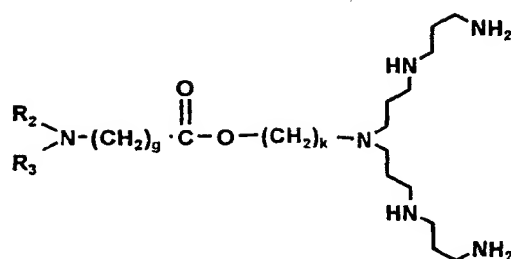
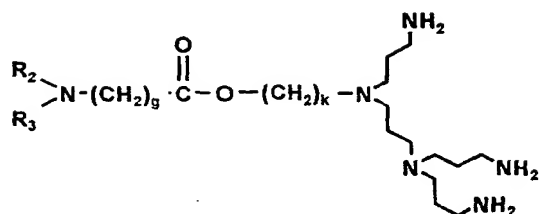
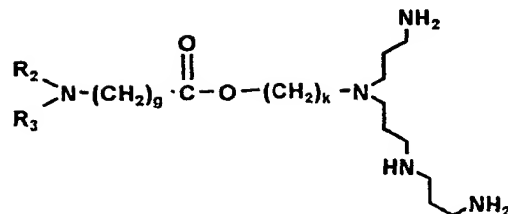
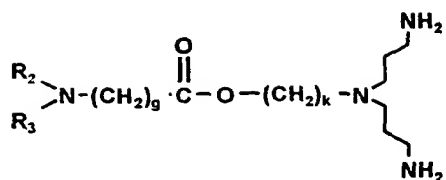
51



wobei $k = 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

6. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

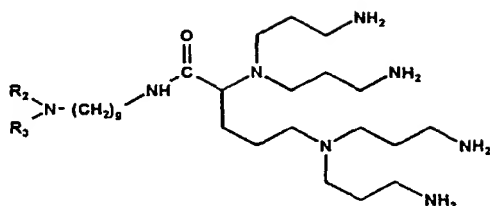
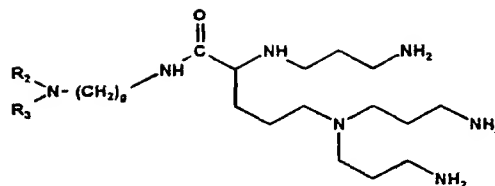
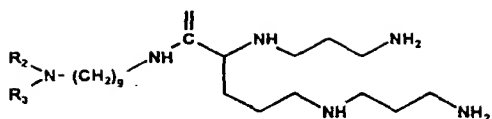
52



wobei $k = 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

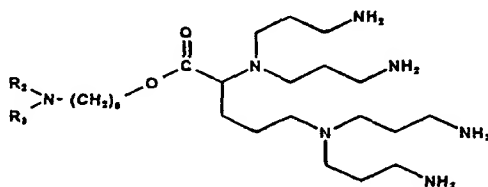
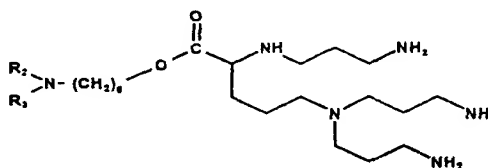
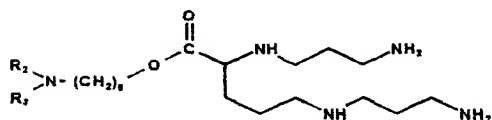
7. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:

53



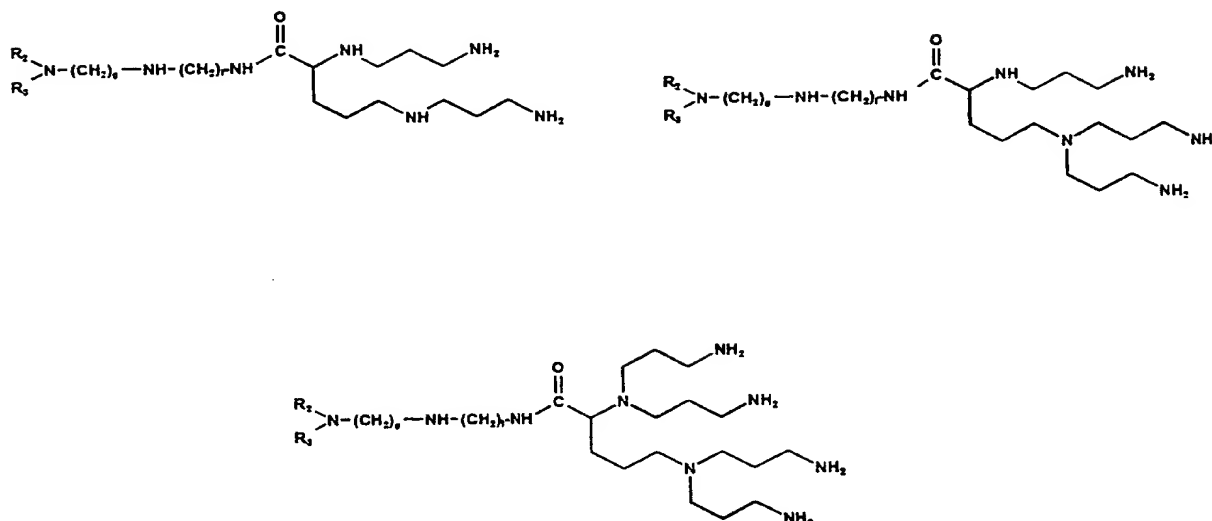
wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein kann und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

8. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:



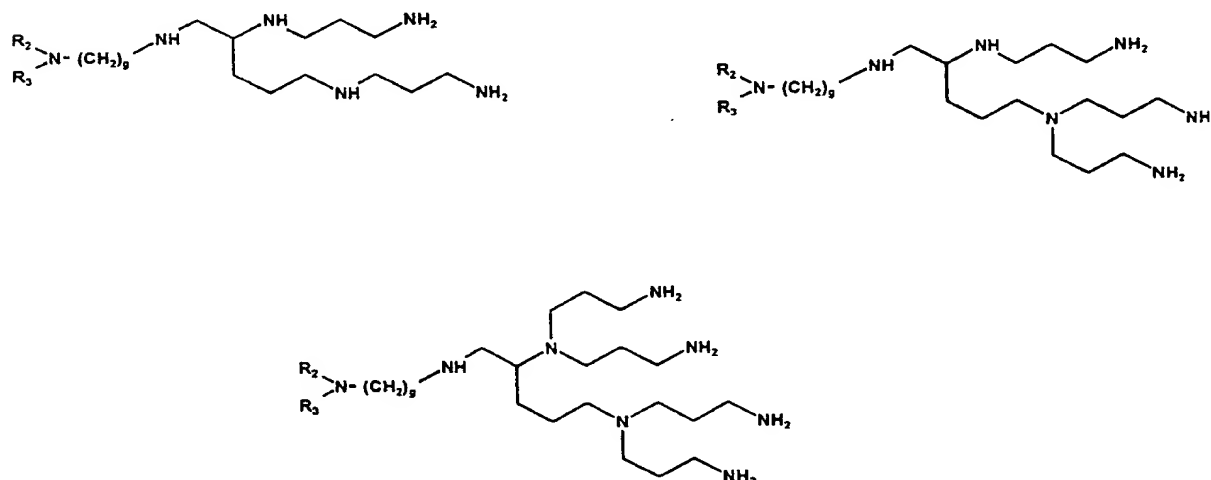
wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein kann und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

9. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:



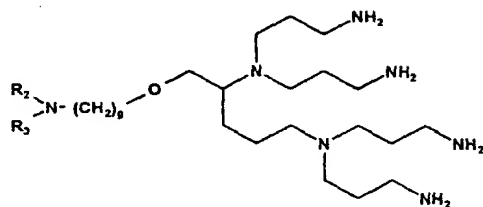
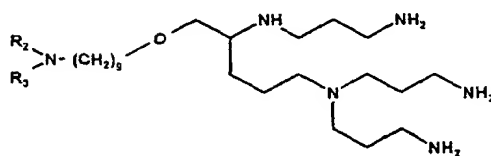
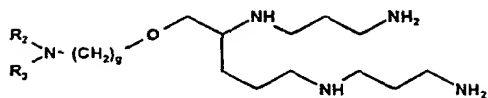
wobei $l = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein können und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

10. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:



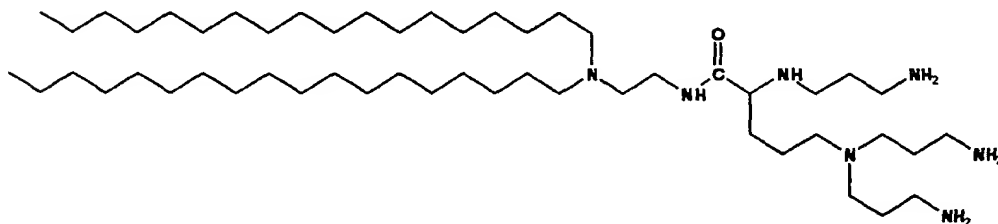
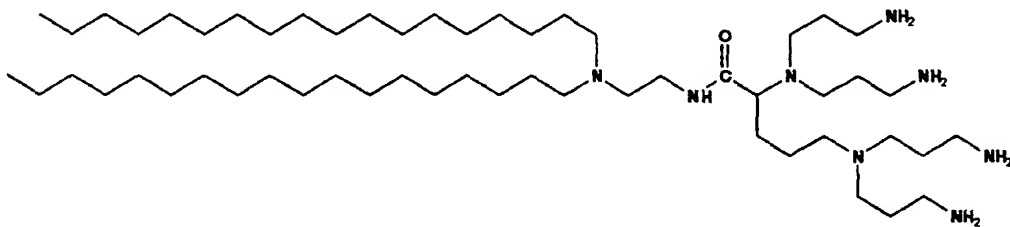
wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein kann und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

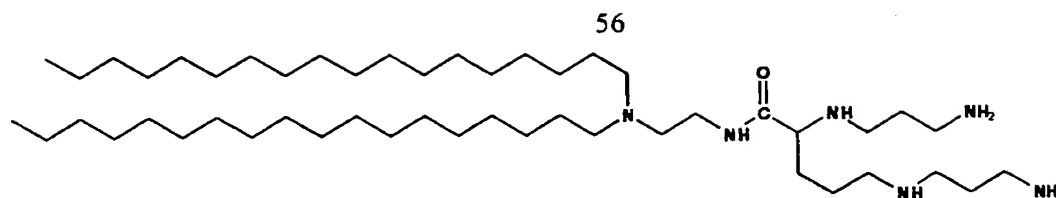
11. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:



wobei $g = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 sein kann und R_2 und R_3 unabhängig voneinander Dodecyl, Dodecenyl, Tetradecyl, Tetradecenyl, Hexadecyl, Hexadecenyl, Octadecyl oder Octadecenyl sein können.

12. Verbindungen und ihre Salze entsprechend Anspruch 1 mit folgenden Strukturen:





13. Zusammensetzungen, die mindestens eine der Verbindungen der Ansprüche 1-12 mit oder ohne Colipide, wie z.B. Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Dioleoylphosphatidylcholin, Cholesterol oder Cholesterylamin und gegebenenfalls übliche Zusatzstoffe, Träger oder Adjuvantien enthalten.

14. Medizinische oder diagnostische Zusammensetzungen, die mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder eine Zusammensetzung nach Anspruch 13 enthalten.

15. Verfahren zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen, wobei Verbindungen oder Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1-14 mit den einzubringenden Verbindungen komplexiert und die entstandenen Komplexe mit eukariotischen Zellen (in vivo oder) in vitro in Kontakt gebracht werden.

16. Verwendung der Verbindungen oder Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1-14 zur Herstellung eines Medikaments oder eines Reagenzes zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, PNA, Peptiden, Peptoiden und Proteinen in eukariotische Zellen in vivo oder in vitro.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Verbindungen in Kombination mit Enhancern verwendet werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 98/05156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07C211/14 C07C237/10 A61K47/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07C A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 03939 A (DWYER BRIAN PATRICK ;GENTA INC (US); BROWN BOB DALE (US); DAILY WI) 6 February 1997 see claims 1-18,21-40; example 6	1-17
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17 March 1994 cited in the application see claim 1; figure 1	1-17
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24 October 1990 cited in the application see abstract	1-17
A	WO 91 16024 A (VICAL INC) 31 October 1991 cited in the application see abstract	1-17
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 1999

Date of mailing of the international search report

12/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rufet, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05156

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 00241 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;FERNHOLZ ERHARD (DE); ELTZ HERBERT VON D) 3 January 1997 cited in the application see abstract; claim 1; figure 7 ---	1-16
A	EP 0 544 292 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2 June 1993 cited in the application see abstract -----	1,15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9703939 A	06-02-1997	AU 6649496 A EP 0869937 A	18-02-1997 14-10-1998
WO 9405624 A	17-03-1994	US 5334761 A EP 0656883 A JP 8509953 T	02-08-1994 14-06-1995 22-10-1996
EP 0394111 A	24-10-1990	FR 2645866 A AT 154035 T CA 2014518 A DE 69030839 D DE 69030839 T DK 394111 T ES 2104593 T FR 2646161 A GR 3023691 T IL 94077 A JP 2292246 A JP 2716565 B US 5476962 A US 5616745 A US 5171678 A	19-10-1990 15-06-1997 17-10-1990 10-07-1997 20-11-1997 08-09-1997 16-10-1997 26-10-1990 30-09-1997 29-12-1994 03-12-1990 18-02-1998 19-12-1995 01-04-1997 15-12-1992
WO 9116024 A	31-10-1991	US 5264618 A AU 7854791 A CA 2079814 A EP 0523189 A JP 2538474 B US 5459127 A	23-11-1993 11-11-1991 20-10-1991 20-01-1993 25-09-1996 17-10-1993
WO 9700241 A	03-01-1997	DE 19521412 A AU 6355396 A CA 2224566 A CN 1193316 A EP 0835238 A NO 975853 A	19-12-1996 15-01-1997 03-01-1997 16-09-1998 15-04-1998 16-02-1998
EP 0544292 A	02-06-1993	DE 4139001 A JP 6303987 A	03-06-1993 01-11-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05156

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07C211/14 C07C237/10 A61K47/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07C A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 03939 A (DWYER BRIAN PATRICK ;GENTA INC (US); BROWN BOB DALE (US); DAILY WI) 6. Februar 1997 siehe Ansprüche 1-18,21-40; Beispiel 6 ---	1-17
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17. März 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Anspruch 1; Abbildung 1 ---	1-17
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24. Oktober 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-17
A	WO 91 16024 A (VICAL INC) 31. Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-17
-/--		



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/01/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rufet, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern .ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05156

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 00241 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;FERNHOLZ ERHARD (DE); ELTZ HERBERT VON D) 3. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbildung 7 ---	1-16
A	EP 0 544 292 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2. Juni 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung -----	1,15-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 98/05156

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9703939 A	06-02-1997	AU 6649496 A EP 0869937 A	18-02-1997 14-10-1998
WO 9405624 A	17-03-1994	US 5334761 A EP 0656883 A JP 8509953 T	02-08-1994 14-06-1995 22-10-1996
EP 0394111 A	24-10-1990	FR 2645866 A AT 154035 T CA 2014518 A DE 69030839 D DE 69030839 T DK 394111 T ES 2104593 T FR 2646161 A GR 3023691 T IL 94077 A JP 2292246 A JP 2716565 B US 5476962 A US 5616745 A US 5171678 A	19-10-1990 15-06-1997 17-10-1990 10-07-1997 20-11-1997 08-09-1997 16-10-1997 26-10-1990 30-09-1997 29-12-1994 03-12-1990 18-02-1998 19-12-1995 01-04-1997 15-12-1992
WO 9116024 A	31-10-1991	US 5264618 A AU 7854791 A CA 2079814 A EP 0523189 A JP 2538474 B US 5459127 A	23-11-1993 11-11-1991 20-10-1991 20-01-1993 25-09-1996 17-10-1993
WO 9700241 A	03-01-1997	DE 19521412 A AU 6355396 A CA 2224566 A CN 1193316 A EP 0835238 A NO 975853 A	19-12-1996 15-01-1997 03-01-1997 16-09-1998 15-04-1998 16-02-1998
EP 0544292 A	02-06-1993	DE 4139001 A JP 6303987 A	03-06-1993 01-11-1994